



TITLE:

# HP1非依存的なSuv39h1によるペリセントロメアヘテロクロマチンの形成( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

村松, 大輔

---

CITATION:

村松, 大輔. HP1非依存的なSuv39h1によるペリセントロメアヘテロクロマチンの形成. 京都大学, 2013, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17930>

RIGHT:

HP1 非依存的な Suv39h1 による  
ペリセントロメアヘテロクロマチンの形成

村松 大輔

# HP1 非依存的な Suv39h1 によるペリセントロメアヘテロクロマチンの形成

目次	ページ
論文要旨	3
第一章 序論	
1-1 はじめに	5
1-2 ヒストンタンパク質の翻訳後修飾について	6
1-3 DNA のメチル化について	8
1-4 構成的ヘテロクロマチンについて	9
1-5 Suv39h および HP1 について	10
第二章 実験手法	13
第三章 研究結果	
3-1 Suv39h1 は N 末端領域で HP1 と相互作用し、SET ドメインによりヒストンのメチル化を行う	22
3-2 Suv39h1 は HP1 との相互作用非依存的にペリセントロメア領域への H3K9me3 修飾を触媒する	23
3-3 マウス ES 細胞において Suv39h1 はヘテロクロマチンの形態に影響を与えない	26
3-4 H3K9me3 の下流に位置する H4K20me3 修飾と ATRX のペリセントロメア領域への蓄積は HP1 依存的である	26

3-5	Suv39H1 は HP 1 会合・蓄積非依存的に DNA のメチル化を誘導する	29
3-6	メジャーサテライトの転写抑制には HP1 が必要である	30
第四章 考察		
4-1	Suv39h1 は HP1 会合・蓄積非依存的にペリセントロメア領域へ H3K9me3 修飾を誘導し維持することができる	32
4-2	HP1 は Suv39h1 の下流に位置する反応を誘起するために必要である	33
4-3	Suv39h1 は HP1 非依存的に DNA のメチル化を誘導することができる	35
4-4	メジャーサテライトリピートの転写抑制には HP1 が必要である	35
4-5	まとめと今後の展開	36
図表の説明		38
図表		47
謝辞		76
引用文献		77



## 要旨

染色体においてペリセントロメア領域は高度に凝縮したヘテロクロマチン構造をとっている。この領域の特徴としてはヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のトリメチル化修飾 (H3K9me3) の蓄積が挙げられ、このエピジェネティックマークは主にヒストンメチル化酵素である Suv39h により触媒される。ヘテロクロマチンタンパク質である HP1 は Suv39h と親和性を持ち、またメチル化された H3K9 を認識することでペリセントロメア領域に蓄積することがわかっている。筆者はこの Suv39h と HP1 との間の相互作用がペリセントロメア領域のヘテロクロマチン構造の構築においてどのような機能を果たしているのかを明らかにするため研究を行った。まず *Suv39h1/h2* のダブルノックアウト ES (*Suv39h dn ES*) 細胞へ野生型 Suv39h1 と HP1 との相互作用領域を欠いた変異型 Suv39h1 を導入した安定発現株を樹立し、これら細胞株のペリセントロメア領域を免疫染色にて観察した。その結果、野生型 Suv39h1 および変異型 Suv39h1 の両安定発現株においてペリセントロメア領域の H3K9me3 修飾の蓄積の回復がみられた。しかし野生型 Suv39h1 発現株においてはペリセントロメア領域への HP1、ATRX、H4K20me3 修飾の蓄積の回復が見られたのに対して、変異型 Suv39h1 発現株ではこれらの回復がほとんどなかった。この結果は、ペリセントロメア領域においては HP1 非依存的に Suv39h が局在化し、H3K9me3 修飾の蓄積を行うことができること、Suv39h と HP1 の二分子間の相互作用は HP1 を安定的にペリセントロメア領域に局在させ、ATRX や H4K20me3 修飾の蓄積を誘導するために必要であることを示唆するものであった。一方これら細胞株におけるペリセントロメア領域の DNA のメチル化状況を調べたところ、*Suv39h dn ES* 細胞で低下していた DNA メチル化は野生型だけではなく、HP1 と結合しない Suv39h1 を発現させても回復することがわかった。また、マウスのペリセントロメア領域を構成しているメジャーサテライトリピートの発現は、Suv39h1 に依存して転写抑制を受けているが、*Suv39h dn ES* 細胞で脱抑制されたメジャ

ーサテライトリピートは、HP1 と結合しない変異型 Suv39h1 によっては不完全にしか抑えられないことがわかった。今回の研究により、ペリセントロメア領域においては HP1 会合非依存的に Suv39h による H3K9me3 修飾の誘導及び確立が行われるが、完全な転写抑制的ヘテロクロマチンの形成には HP1 の動員が必要であることが示唆された。

## 第一章 序論

### 1-1 はじめに

ヒトを含む多細胞生物の 1 個体を構成する細胞は、一部の例外を除きすべて同一のゲノム情報を有している。しかし、細胞の性質は組織や、細胞の置かれている環境により大きく異なる。例えば神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索、軸索末端といった構造的な特徴を持ち、情報処理と情報伝達という機能を発揮するように特化している。一方、腸や気道などに存在する杯細胞は、杯状の形状で、細胞質に大量の分泌顆粒を持つという構造的特徴を持ち、粘液の分泌を行い粘膜の形成をするという機能を持つ。このようにそれぞれの細胞により特徴的な構造、機能を発揮することができるのは、組織特異的な遺伝子発現制御が行われていることに起因する。この組織特異的な遺伝子発現パターンは、分化、発生の過程で形成されて行く。多細胞生物の分化、発生に伴う細胞分裂においては、基本的に親細胞の遺伝子発現プロファイルを引き継ぎながら、段階的に特定の遺伝子の発現のオンとオフを切り替えることで、それぞれの末端に位置する細胞の性質を獲得していくことが知られている。細胞分裂を経た後にも娘細胞は母細胞の特徴を引き継ぐ現象は、さながら細胞がある種の記憶を持っており、それを母細胞から娘細胞へ受け渡しているように見受けられる。このような特有の細胞に分化した細胞が、その形質を維持し、あるときは細胞複製を越えてそれが継承されることを「細胞記憶」と呼ぶ。

上述した DNA の塩基配列の変化を伴わない細胞ごとの遺伝子発現の差異、そして細胞記憶を生み出す機構を研究する学問領域はエピジェネティクスと呼ばれ、現在までにヒストンタンパク質の翻訳後修飾、DNA のメチル化、そして非翻訳 RNA による RNA 干渉などがエピジェネティック制御機構として研究されている(1)。

## 1-2 ヒストンタンパク質の翻訳後修飾について

真核生物のゲノム DNA は非常に大きく、ヒトの場合は約 60 億塩基対からなり一細胞当たりの DNA をすべて直列に並べたとすると約 2m にものぼると言われている。このような長大な分子を直径約 5nm の細胞核に収納することは非常に困難であるように感じられる。しかし、実際は核内にゲノム DNA は秩序だって収納されており、遺伝子発現制御や細胞分裂に伴う娘細胞への染色体の分配など複雑な細胞活動に対応している。このように巨大分子であるゲノム DNA を秩序をもって核内に収納する役割を担っているのがヒストンである。ヒストンは大きく H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類に分類され、ヒストン H1 を除く 4 種類をコアヒストンと呼ぶ。コアヒストンはそれぞれ 2 分子ずつ会合し、ヒストン八量体を形成する。一つのヒストン八量体は約 146 bp の DNA を約 1.65 回外側に巻きつける。この DNA とヒストン八量体との複合体をヌクレオソームと呼び、ヌクレオソームを最小単位としてさらに他のタンパク質が会合し高次クロマチン構造が形成される。このようにゲノム DNA は糸巻きの役割を果たすヒストンによってコンパクトに折りたたまれることによって核内に秩序だって収納されている（図 1）(1)。

またヒストンは単にゲノム DNA を核内に収納するだけではなく、クロマチン構造の変化や X 染色体の不活性化、遺伝子発現制御においても非常に重要な役割を担っている。コアヒストンはその N、C 末端にヒストンテールと呼ばれる決まった立体構造を取らない領域を有しており、メチル化、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化などの様々な化学修飾を受けることがわかっている。例えばヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) はメチル化及びアセチル化修飾を受け、また H3S10 はリン酸化修飾を受けるなど特定のアミノ酸残基に特定の化学修飾がなされることがわかっている。そして、それぞれの化学修飾は遺伝子発現やクロマチン構造の変化に多大な影響を与える。例えば H3K9 へのメチル化及びアセチル化はそれぞれ遺伝子発現の抑制及び活性化に関与している。このようにヒストンテ

ールへの化学修飾の組み合わせにより様々な細胞機能が誘導されるという概念のことをヒストンコードと呼ぶ(2)。

前述したようなヒストン修飾の一つにはリーダー(reader)と呼ばれるタンパク質群に読みとられることによってその機能を実効たらしめる。例えば H3K9 のメチル化修飾は HP1(heterochromatin protein 1)により認識されることが知られている。HP1 はその N 末端にメチル化された H3K9 に親和性を示すクロモドメインを有しており、その結果、メチル化された H3K9 を有するクロマチンに局在 (結合) する(3, 4)。クロモドメインを介してクロマチンへ結合した HP1 はさらにその他のクロマチンタンパク質を誘導し、メチル化された H3K9 が蓄積している領域のクロマチン構造を凝縮させ、結果そこに存在している遺伝子の発現を抑制すると言われている(5)。他方、転写活性化複合体の構成因子の多くはアセチル化ヒストンを認識するプロモドメインを有していることが知られている。そのため、アセチル化修飾が蓄積した遺伝子座に乗っている遺伝子の転写は活性化する(6)。このようにそれぞれのリーダータンパク質は、それぞれのヒストン修飾へ結合し、その他のタンパク質を誘導することで、ヒストン修飾の機能を発揮させていると考えられている (図 2)。

これまでの精力的な研究により、多くのヒストン修飾を触媒する酵素 (ヒストン修飾酵素) が同定されてきた。それぞれのヒストン修飾酵素は、ヒストンテールの特定のアミノ酸残基に特異的に作用することが知られている。例えば、ESET は H3K9、Ezh2 は H3K27 を特異的にメチル化する(7, 8)。また、リジン残基のメチル化は、モノメチル化、ジメチル化そしてトリメチル化の 3 つの状態を取ることが可能で、それぞれのメチル化酵素は決まった数のメチル基をリジン残基へ転位する制御に関わっている。例えば ESET と Suv39h1/h2 は H3K9 のトリメチル化、PR-Set7 は H4K20 のモノメチル化、Suv4-20h1/h2 は H4K20 のトリメチル化の制御に重要な役割を果たしている (7, 9)。

表 1 にヒストン H3 と H4 のそれぞれのアルギニン残基、リジン残基へメチル基を転移する酵素と、それぞれの修飾の機能の一覧を示す。表 1 には代表的なメチル化酵素を示した

が、これら以外にも多くのヒストンメチル化酵素が同定されている。また表には示さなかったが H2A、H2B のテールにもメチル化修飾がなされることが報告されている。そして、メチル化以外のヒストン修飾(アセチル化、リン酸化、ユビキチン化など)を触媒する酵素、及びこれらの修飾がなされるアミノ酸残基もこれまでに多数報告されている。

他方、ヒストンの化学修飾を外す酵素も数多く報告されており、ヒストンの化学修飾は可逆的であることがわかっている。その中でも脱メチル化酵素及び脱アセチル化酵素が最もよく研究されている。ヒストンのリジン残基の脱メチル化反応を修飾する酵素は KDM1～6 の 6 つのファミリーに分類することができ、それぞれ標的とするリジン残基や外すメチル基の数、作用する遺伝子座が異なることがわかっている(10)。また、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC ファミリーは現在まで HDAC1～11 まで同定されている(11)。

つまり、ヒストンの化学修飾を介した細胞機能の制御機構は、多様性に富んだ修飾酵素群とそれを外す酵素群のバランス、そして、様々なヒストン修飾の組み合わせによってもたらされる、非常に複雑で高度なものであるといえる。

### 1-3 DNA のメチル化について

ヒストン修飾の他、DNA のメチル化も遺伝子の発現調節に関わる重要なエピジェネティック修飾として知られている。哺乳類ではシトシンの 5 位の炭素へのメチル基の付加が主に起こり、ゲノム上では CpG という 2 塩基の配列におけるシトシン残基になされる (図 3 A) (33)。マウスにおいては DNA のメチル化は Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の三種類の酵素によって触媒されることがわかっている。Dnmt1 は DNA が複製された時に生じるヘミメチル化状態の DNA を基質とすることから、維持メチル化酵素と呼ばれており、Dnmt3a/b は非メチル化状態の DNA を基質とすることから新規メチル化酵素と呼ばれている(図 3 B)(33)。メチル化酵素によりメチル化を受けたシトシン残基は MBD や MeCP2 といったメチル化 DNA

結合タンパク質を呼び込む。そして、シトシンがメチル化されたことによる物理的な効果や、メチル化 DNA 結合タンパク質によって、転写複合体の DNA への結合が阻害される。その結果、メチル化されている遺伝子座に位置する遺伝子の転写が抑制されると考えられている (図 3 C)(34)。

DNA メチル化酵素は、転写抑制に関わるヒストン修飾酵素 (ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素) や、HP1 のようなメチル化ヒストン結合タンパク質と相互作用することが知られている。また MeCP2 や MBD などのメチル化 DNA 結合タンパク質も、これらヒストン修飾関連因子と相互作用することがわかっている。また遺伝学的な研究により、いくつかの系でヒストン修飾と DNA のメチル化は片方が上位のあるいは相互依存の関係にあることも示されている。例えば、アカパンカビの DNA メチル化はヒストン H3K9 メチル化酵素 Dim5 により制御されており、植物のある部分の DNA メチル化と H3K9 メチル化制御は相互依存の関係にある (35)。

上述したように、DNA のメチル化とヒストン修飾は非常に密接な関係にあることが示されている。図 4 に哺乳類のヒストンメチル化酵素 (Suv39h1, G9a, ESET)、ヒストン脱メチル化酵素(Hdac1、Hdac2)、DNA メチル化酵素(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b)、メチル化ヒストン結合タンパク質(HP1 $\alpha$ 、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$ 、ATRX)、そしてメチル化 DNA 結合タンパク質(MBD1、MBD2、MeCP2)の相互作用関係を示す。

#### 1-4 構成的ヘテロクロマチンについて

先に述べた H3K9 のメチル化や DNA のメチル化は、これらの修飾を認識する複数のタンパク質により認識されることによって、そのクロマチン構造を凝縮させる。この凝縮したクロマチン構造のことをヘテロクロマチンと呼ぶ。ヘテロクロマチンは条件的(facultative)ヘテロクロマチンと構成的(constitutive)ヘテロクロマチンの 2 種類に分類できる。条件的ヘ

テロクロマチンは、発生・分化に伴う遺伝子発現制御のために形成されるヘテロクロマチンであり、細胞の置かれている環境によって可逆的に特定の遺伝子領域のクロマチン構造を選択的に凝縮する。一方、構成的ヘテロクロマチンは発生・分化、細胞周期を通して恒常的に存在するヘテロクロマチンである。構成的ヘテロクロマチンはセントロメアやテロメアなどの染色体の機能ドメインまたはその近傍に主に形成されている。構成的ヘテロクロマチンは染色体の安定性に寄与していることが示唆されており、その異常は染色体の不安定性を引き起こし、分裂の際の姉妹染色分体の分配異常や異常染色体の形成につながる。マウス染色体においてはセントロメア近傍に位置するペリセントロメア領域、分裂酵母においてはセントロメアと *mating-type* 領域が構成的ヘテロクロマチンとして凝縮しており、これら構成的ヘテロクロマチンの形成機構を明らかにするために精力的な研究がこれまでになされてきた(68)。

#### 1-5 Suv39h および HP1 について

ショウジョウバエにおける遺伝学的なスクリーニングにより斑入り位置効果 (PEV : Position effect variegation) の抑圧変異として 30~40 の *Su(var)* グループの遺伝子が同定された(69)。このグループに属する遺伝子である *Su(var)3-9* 及び酵母、マウス、ヒトにおけるホモログである *clr4*、*Suv39h1/h2*、*SUV39H1/H2* にコードされているタンパク質は N 末端にクロモドメイン、C 末端に SET ドメインを有する。そしてこれらのタンパク質はヒストンメチル化活性を持ち、ヘテロクロマチンの形成に非常に重要な役割を担っていることが示されている(70)。一方、同様に *Su(var)* グループ遺伝子として同定された *HP1* は N 末端にクロモドメイン、C 末端にクロモシャドウドメインを持つタンパク質をコードしている。*HP1* は上述したように、クロモドメインによりメチル化された H3K9 を認識することでヘテロクロマチン領域へ集積することが知られている(3, 4)。



哺乳類細胞においてはセントロメアとペリセントロメア、酵母においてはセントロメア、*mating-type* 領域において Suv39h/Clr4 による H3K9me3/2 修飾と HP1/Swi6 の蓄積が見られ、高度に凝縮した構成的ヘテロクロマチンを形成する(71)。マウス染色体におけるペリセントロメア領域では H3K9me3 修飾の他、H4K20me3 修飾、DNA メチル化といった転写抑制に関わるエピジェネティック修飾が蓄積していることがわかっている。そして *Suv39h1/h2* を両方とも欠失させたマウスの細胞(*Suv39h dn*)においてはペリセントロメア領域での H3K9me3 修飾、H4K20me3 修飾の蓄積の喪失、HP1 の非局在化、DNA メチル化レベルの低下が観察される(72, 73, 74)。このように Suv39h はヘテロクロマチン構造の形成において上流に位置する重要な分子であると言える。

通常、野生型細胞のペリセントロメア領域では Suv39h 自身の局在化が見られる。そして、ペリセントロメア領域から H3K9me3 修飾が喪失している *Suv39h dn* 細胞に、野生型の Suv39h を発現させると、ペリセントロメア領域への自身の局在と H3K9me3 修飾が回復する。一方、メチル化活性のない Suv39h の変異体では、野生型細胞に発現させた場合では変異体のペリセントロメア局在が誘導されるのに対して、*Suv39h dn* 細胞ではそのペリセントロメア局在は回復しない。これらの実験結果より、Suv39h の局在化と H3K9me3 修飾のペリセントロメア領域への誘導・蓄積は必要十分条件を満たす関係にあると考えられている (64)。一方、HP1 は H3K9me3 修飾への強い親和性を持ち、また Suv39h と複合体を形成することから(75, 76, 77)、Suv39h は HP1 と共同してペリセントロメアヘテロクロマチンの形成を行っていると考えられている。つまり Suv39h が HP1 の足場である H3K9me3 修飾を触媒し、それを認識した HP1 が Suv39h をペリセントロメア領域へ誘導してくるという反応開始・拡大モデルが有力である (図 5)。しかし、Suv39h が HP1 に依存しなければ H3K9me3 修飾をペリセントロメア領域へ確立できないという直接的な証拠はなかった。そこで筆者は Suv39h と HP1 との間の相互作用に着目し、ペリセントロメア領域における Suv39h による H3K9me3 修飾の確立における HP1 との関係性の意義を明ら

かにすることを目的に研究を進めた。

## 第2章 実験手法

### プラスミド

N末端に Flag タグを融合した、Suv39h1、酵素活性の無い Suv39h1 の変異体 (Suv39h1<sup>H324L</sup> (H324L))、そして N末端の 1~41 アミノ酸を欠いた Suv39h1 の変異体 (Suv39h1<sup>( $\Delta$ 1-41)</sup> ( $\Delta$ N)) の発現ベクターは、pCAG-FLAG-IRESpuro ベクターへサブクローニングした。また、C末端に myc タグを癒合した、HP1 $\alpha$ 、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$ の発現ベクターは、pcDNA3.1-Myc/HIS vector へサブクローニングされている。

### 抗体

ウエスタンブロット解析、免疫染色そしてクロマチン免疫沈降に使用した抗体は以下の通りである。抗 H3K9me3 抗体 (2F3)、抗 H4K20me3 抗体 (27F10)、抗 Flag 抗体 (Sigma, F3165)、抗 myc 抗体(3F10)抗 HP1 $\alpha$ 抗体 (ウエスタンブロット解析用) (Millipore, MAB3584)、抗 HP1 $\alpha$ 抗体(Millipore, MAB3446)、抗 HP1 $\beta$ 抗体(MBL, BMP002)、抗 HP1 $\gamma$ 抗体 (MBL, BMP003)、抗チューブリン抗体 (Oncogene, CP-06)、抗 ATRX 抗体 (Santa Cruz, sc-15408)、抗 Dnmt1 抗体 (Santa Cruz, sc-20701)、抗 Dnmt3a 抗体 (Santa Cruz, sc-52921)、抗 Dnmt3b 抗体 (IMGENEX, IMG-184A)

### ウエスタンブロット解析

回収した細胞をサンプルバッファー (5% 2-メルカプトエタノール、20 mM Tris-HCl pH8.8、1% SDS) に懸濁した。次にこれを超音波破碎装置で破碎し、95℃で 3 分煮沸した。加熱されたサンプルを SDS アクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。その後、5% スキムミルク T-TBS(0.05 M Tris, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.1% tween 20)溶液にニトロセルロース膜を浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。次に T-TBS で希釈

した一次抗体溶液にニトロセルロース膜を浸し、室温で 1 時間反応させた。一次抗体反応後にニトロセルロース膜を T-TBS で洗浄し、希釈した二次抗体溶液に浸した。二次抗体反応は室温で 45 分を行った。二次抗体反応後のニトロセルロース膜を T-TBS で洗浄し、最後に HRP 化学発光液 (perkinElmer, Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus) と 1 分間反応させ、ニトロセルロース膜をサランラップで包み、X 線フィルムでオートラジオグラムを行った。

#### タンパク質免疫沈降法

トランスフェクション試薬として LT-1 (タカラバイオ) を使用し、発現ベクターを HEK293T 細胞株へトランスフェクションした 48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞を 1×PBS で洗浄した後、1×PBS (5mM DTBP 含む) に懸濁し、4°C で 1 時間反応を行い、DTBP によるタンパク質間の架橋反応を行った。架橋反応後の細胞を 1×PBS で洗浄した後、可溶性バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.3% digitonin, 20 mM N-ethylmaleimide) に懸濁し、4°C で 30 分間反応を行った。そして 15000rpm、4°C で 10 分間遠心し、その上清を別のチューブへ移した。この上清へ抗体を加え 4°C で 2 時間反応した後、サンプルにプロテイン G セファロースビーズを 10  $\mu$ l 加え、さらに 4°C で 2 時間反応した。ただし、Flag 抗体で免疫沈降する際には抗 Flag 抗体アフィニティーゲル (Sigma, A2220-10ML) を 10  $\mu$ l 上清へ加え、4°C で 2 時間反応した。反応後のプロテイン G セファロースビーズ及び抗 Flag 抗体アフィニティーゲルを 1×PBS で 3 回洗浄し、1×SDS サンプルバッファーを加え、煮沸しウエスタンブロッティング用のサンプルとした。抗 Flag 抗体アフィニティーゲルに関しては、1×PBS での洗浄後に、溶出バッファー (3×Flag ペプチド 150 ng /  $\mu$ l 1×TBS) にて溶出した免疫沈降物へ 4×SDS サンプルバッファーを加え、煮沸しウエスタンブロッティングのサンプルとした。

#### ヒストンメチル化アッセイ

HEK293T 細胞へ Flag タグ付きの Suv39h1 及びその変異体の発現ベクターをトランスフェクションし、二日培養した。回収した細胞を可溶化バッファー (420 mM NaCl, 20 mM Hepes pH7.5、 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40) に懸濁し、4℃で 30 分間反応させた。そして 15000rpm、4℃で 10 分間遠心し、その上清を別のチューブへ移した。この上清へ抗 Flag 抗体アフィニティーゲル(Sigma, A2220-10ML)を 10  $\mu$ l 加え、4℃で一晩反応させた。その後、可溶化バッファーで洗浄した後、1 $\mu$ L の 10 $\times$ コリンズバッファー(250 mM Tris-HCl pH8.5、 50 mM DTT)、精製ヒストン H3/4 1 $\mu$ L (各 1 $\mu$ g)、0.5  $\mu$ L の <sup>14</sup>C-S-アデノシルメチオニン(PerkinElmer)、7.5  $\mu$ L の H<sub>2</sub>O を加え攪拌し、30℃で 1 時間反応させた。そこへ 4 $\times$ SDS サンプルバッファーを加え、96℃で 5 分煮沸し、氷上で急冷した。このサンプルを 16% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にて分離した。泳動後のゲルを固定液(50% メタノール、10% 酢酸)中 65℃で 20 分固定し、CBB 染色液(0.25% ブリリアントブルー、40% メタノール、 7% 酢酸)中 65℃で 30 分染色後、脱色液 (5% メタノール、 7% 酢酸) 中 65℃で 20 分脱色反応を行った。脱色後のゲルはろ紙にポンプを使用して乾燥貼付したあと、サランラップに包み、オートラジオグラムイメージをイメージングプレートに焼き付け、BAS-5000(FUJIFILM)によって解析した。

#### Micrococcal Nuclease (MNase)耐性試験

2 $\times$ 10<sup>6</sup>の細胞を回収し 5 ml の 1 $\times$ PBS で洗浄し、4℃ 300g で 5 分間遠心した。上清を捨て、細胞ペレットへ NP-40 可溶化バッファー(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine)を加え懸濁し、氷上で 5 分間静置した。4℃ 120g で 10 分間遠心し上清を捨てた。細胞核ペレットを MNase digestion バッファー(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine)で洗浄し、4℃ 120g で 10 分間遠心した後、上清を捨てた。

そこへ MNase digestion バッファーを 1 ml 加え核ペレットを懸濁し、100  $\mu$ L ずつ別のチューブへ分注した。その核懸濁液へ MNase (0~20 unit) を加えピペッティング後、すぐに 16°C の水浴へチューブを浸け 5 分間反応させた。そこへ 80  $\mu$ l の MNase バッファーと、20  $\mu$ L の MNase stop バッファー(100 mM EDTA, 10 mM EGTA)を加え、MNase の消化反応を停止させた。そこへ 3  $\mu$ L の PK(20 mg/ml)と 10  $\mu$ L の 20% SDS を加え、37°C で一晩反応させた。このサンプルから、フェノール/クロロホルム処理の後、エタノール沈殿によって DNA を精製した。この DNA サンプルを 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、後述する手順でサザンブロッティングを行った。この時使用した DNA プロブは、後述するメジャーサテライト配列である。

#### 細胞培養

本研究においては、野生型 ES 細胞株として TT2 細胞株を使用した。*Suv39h1/h2* dn ES 細胞株は Thomas Jenuwein 博士より譲渡されたものである。ES 細胞は 15% fetal calf serum, leukaemia-inhibiting factor (LIF), penicillin/streptomycin, L-glutamine, non-essential amino acids 、  $\beta$ -mercaptoethanol を含む Dulbecco' s modified Eagle' s medium (Sigma)中で培養した。Flag-Suv39h1、Flag-H324L、Flag- $\Delta$ N の安定発現株は、それぞれの発現ベクターを直鎖状化した DNA 断片を、*Suv39h* dn ES 細胞株へエレクトロポレーションし、ピューロマイシン ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ )で選別を行い樹立した。

#### 免疫染色

チャンバースライド(nunc, 177437JP)上で培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒド 1×PBS にて室温、8 分間固定した。1×PBS で洗浄した後、1% Triton X-100 1×PBS で細胞を透過処理した。1×PBS で洗浄後、3% BSA、0.1% tween 20 1×TBS で 15 分ブロッキングした。このブロッキングバッファーに一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。

1×PBS で洗浄後、室温 1 時間で二次抗体反応を行った。核は DAPI で染色した。サンプルは共焦点蛍光顕微鏡 (Olympus, FV1000) で観察した。

#### クロマチン免疫沈降 (ChIP)

(クロスリンク-ChIP) 細胞( $5 \times 10^6$ )を回収し 1×PBS で洗浄し、5%ホルムアルデヒドを含む 1×PBS 5ml にて、室温、5 分で固定した。5%ホルムアルデヒド溶液を除去した後、1M グリシン 1×PBS 5 ml に細胞を懸濁し、室温、10 分で中和した。1×PBS で細胞を洗浄した後に NP-40 バッファー (10 mM, Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, NP-40 0.5%) 5ml に細胞を懸濁し、室温で 10 分間インキュベーションした。NP-40 バッファーを除去した後、細胞ペレットへ SDS 可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS, 10 mM EDTA) 100 $\mu$ l を加え、10 回ピペッティングを行い、そこへ ChIP 希釈バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.11% sodium deoxycholate) 400 $\mu$ l を加え転倒混和させた。この溶液の入ったチューブを超音波破碎装置 Bioruptor (Cosmo Bio) にセットし、(15 秒 ON、15 秒 OFF)  $\times$ 24 サイクルで超音波破碎を行った。15000rpm、4°C で 10 分間遠心を行い、上清を別のチューブへ移し、そこへ 500 $\mu$ l の ChIP 希釈バッファーを加え 1ml の溶液とした。この溶液からさらに 300 $\mu$ l を別のチューブへ移し、そこへ 200 $\mu$ l の 1×RIPA バッファー-150 mM (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate)を加えた。この溶液へ抗体を加え、4°C で 4 時間反応を行った。抗マウスもしくは抗ラビット IgG を結合させた磁気ビーズ (Invitrogen, 112.01D, 11203D)を 20 $\mu$ l 加え、さらに 1 時間反応させ、免疫複合体を回収した。この免疫複合体と結合したビーズを、1×RIPA バッファー-150 mM、1×RIPA バッファー-500 mM (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate)で一回ずつ、そして 1×TE で 2 回洗浄を行った。このビーズへ 200  $\mu$ l の ChIP 溶出バッファー(10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS)

と 1  $\mu$ l の RNase 溶液(20 mg/ml)を加え 65°Cに静置することによって脱クロスリンク及び RNA の分解を行った。その後、3  $\mu$ l の proteinase K (20 mg/ml)を加え、56°Cで 1 時間反応させた。そしてフェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行い、DNA ペレットを 1 $\times$ TE を 60  $\mu$ l に溶解させ、RT-qPCR のサンプルとした。RT-pPCR は SYBR green (タカラバイオ)を用い、step one(Applied Biosystems)により PCR 反応、シグナル検出を行った。

(ネイティブ ChIP 法) 細胞( $2 \times 10^6$ )を回収し 1 $\times$ PBS で洗浄し、50  $\mu$ l のバッファー1(60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, 0.3 M sucrose, DTT, PMSF, Aprotinin)に懸濁した。そこへ 50  $\mu$ l のバッファー2(60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, 0.3 M sucrose, 0.8% NP-40, DTT, PMSF, Aprotinin)を加え氷上で 10 分間静置した。そして、800  $\mu$ l のバッファー3(60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, 1.2 M sucrose, DTT, PMSF, Aprotinin)を加え、転倒混和し、4 °Cで 10 分間、8000 rpm で遠心し上清を捨てた。そしてペレットを 200  $\mu$ l の MNase バッファー(0.32 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, PMSF)に懸濁した後、0.3 unit の MNase(TAKARA)を加え、37°Cで 15 分間反応させた。0.5 M EDTA を 10  $\mu$ l 加えた後、4°C 15000 rpm で 10 分間遠心した。そこへ 1.8 ml のインキュベーションバッファー(50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, PMSF)を加えたのち 390  $\mu$ l(コントロール)、と 780  $\mu$ l に分注し、後者に抗体 1  $\mu$ g を加え、4 °Cで一晩反応させた。抗マウスもしくは抗ラビット IgG を結合させた磁気ビーズ(Invitrogen, 112.01D、11203D)を 20 $\mu$ l 加え、さらに 1 時間反応させ、免疫複合体を回収した。回収した磁気ビーズを洗浄バッファーA(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.01% NP-40, 75 mM NaCl)、洗浄バッファーB(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.01% NP-40, 100 mM NaCl)、洗浄バッファーC(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.01% NP-40, 175 mM NaCl)で洗浄し、溶解バッファー(20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl,



0.5% SDS, 100 µg/ml proteinase K)に懸濁し、56℃で3時間反応させた後に、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行い DNA 断片を回収し、DNA ペレットを 1×TE を 60 µl に溶解させ、RT-qPCR のサンプルとした。RT-pPCR は SYBR green (タカラバイオ)を用い、step one(Applied Biosystems)により PCR 反応、シグナル検出を行った。

(RT-qPCR に使用したプライマー)

(プライマー名)	(シーケンス)
major satellite ChIP F	gacgcttgaaaaatgacgaaatc
major satellite ChIP R	catattccaggtccttcagtggtgc
Gapdh ChIP F	atcctgtaggccaggtgatg
Gapdh ChIP R	aggctcaagggtctttaagg

#### サザンブロット解析

ゲノム DNA は細胞のペレットを溶解バッファー(20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.5% SDS, 100 µg/ml proteinase K)に懸濁し、56℃に一晩置くことによって可溶化した。その後フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)抽出後、エタノール沈殿を経てゲノム DNA を抽出した。

ゲノム DNA を *Mae*II で一晩、制限酵素処理し、1%アガロースゲルで電気泳動した。次にゲルを 0.25 M HCl で 30 分間処理することにより DNA を適当に加水分解し、0.4 N NaOH で変性させた後、ナイロン膜に一晩かけてアルカリ転写を行った。その後ナイロン膜を 80℃で1時間加熱し、DNA をナイロン膜に固定させた。次にナイロン膜をプレハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、5×SSCPE、5×デンハルト液、0.5 mg/m サケ精子 DNA、1% SDS) を用いて 42℃で1時間ブロッキングした後、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP で標識されたプローブ DNA を含むハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、5×SSCPE、1×デンハルト液、0.2 mg/m サケ精子 DNA、1% SDS、100 mg/ml デ

キストラン硫酸ナトリウム)を用いて、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。最後にナイロン膜を洗浄バッファー(2×SSC、0.1% SDS)によって 65℃下で洗浄し、オートラジオグラムイメージをイメージングプレートに焼き付け、BAS-5000(FUJIFILM)によって解析した。

本実験で使用したメジャーサテライトの DNA プローブ (338 bp)は、*Suv39h dn* ES 細胞株より抽出した DNA を鋳型として、以下のプライマーを使用して増幅した DNA 断片を *Bam*HI、*Eco*RI で制限処理して、pBluescript SKII(+)へサブクローニングすることによって得た。MajF.*Bam*HI (5' -tacggatccGACGACTTGAAAAATGACGAAATC-3' )

MajR.*Eco*RI(5' -tacgaattcCATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3' )。

メジャーサテライトの DNA プローブの全配列は以下のとおりである。

major                  satellite                  DNA                  プ                  ロ                  ー                  ブ                  :

GACGACTTGAAAAATGACGAAATCACTAAAAAACGTGAAAAATGAGAAATGCACAC  
TGAAGGACCTGGAATATGGCGAGAATACTGAAAATCACGGAAAATGAGAAATACAC  
ACTTTAGGACGTGAATTATGGCGAGGAAAACCTGAAATAGGTGGAAAATTTAGAAAT  
GTCCACTATAGGACATGGAATATGCCAAGAAAACCTGAAAATCATGGAAAATGAGAA  
ACATCCACTTGACCACTTGAAAAATGACGAAATCACTAAGAAACGTGAAAAATGTG  
AAATGCACACTGAAGGACCTGGAATATG

プローブを使用する際には、上記ベクターより、*Bam*HI、*Eco*RI の制限処理によって切り出した。

## RNA の精製

1×10<sup>6</sup>個の細胞を回収し 1ml のセパゾール RNAI (ナカライテスク)を加えたあとに、ボルテックスを行って RNA を可溶化した。次に室温で 10 分静置した後、クロロホルムを 200 μl 加えて再度ボルテックスを行い、室温で 5 分静置した。その後、4℃、15000rpm で遠心を

行い、水相のみを別のチューブへ移した。この溶液へイソプロパノールを加え、4℃、15000rpm で 10 分間遠心を行い、RNA を沈殿させた。沈殿した RNA を 70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後に 1×TE に溶解した。

#### ノーザンブロット解析

前期方法により抽出した RNA を RNA サンプルバッファー(0.8×MOPS、40%ホルムアミド、5%ホルムアルデヒド)に加え、56℃で 15 分間反応した。その後、氷上に 1 分間置いて急冷し、1×MOPS ゲルで電気泳動した。泳動後の RNA は 10×SSC でナイロン膜に転写した。以下の過程はサザンブロット解析と同様に行った。

またサザンブロット解析で使用したメジャーサテライト DNA プローブを使用した。

### 第3章 研究結果

#### 3-1 Suv39h1 は N 末端領域で HP1 と相互作用し、SET ドメインによりヒストンのメチル化を行う

Suv39h1 と HP1 $\alpha$ との間の相互作用についてはこれまで GST タグ付きタンパク質による共沈降解析によって検討がされており、Suv39h1 のクロモドメインより N 末端側に位置する 41 アミノ酸の領域が HP1 との相互作用領域として報告されている(76, 77)。そこで、まず筆者は、Flag タグ付きの Suv39h1(Flag-Suv39h1)と myc タグ付きの HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ (HP1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -myc) (図 6 A) を HEK293T 細胞株において発現させ、免疫沈降法によりこれらの HP1 分子との相互作用を再検討した。その結果、抗 Flag 抗体により Flag-Suv39h1 を免疫沈降すると HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -myc いずれも共沈降することが確認できた(図 6 B lane7~9)。次に、HP1 $\alpha$ との相互作用領域として報告されている Suv39h1 の N 末端領域(1-41)を欠失させた変異体(Flag- $\Delta$ N)でも同様に HP1 との相互作用を調べた。その結果、Flag- $\Delta$ N を免疫沈降しても HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -myc はどれも共沈降しなかった(図 6 B lane10~12)。この結果は、抗 myc 抗体による共免疫沈降実験によっても再現された (図 6 B)。以上より、Suv39h1 の N 末端は HP1 との相互作用において必須の領域であることが明確となった。

さらに、Suv39h1 のメチル化活性についても検証を行った。Suv39h1 は、その C 末端側にある SET ドメインがメチル化活性を担っていることが報告されている (3)。そこで筆者は Suv39h1 の SET ドメイン中のヒストンメチル化活性に重要であることが示唆されているアミノ酸残基を置換した 2 種類の変異体を作成した。1 つは酵素活性が失われる H324L アミノ酸置換体(Suv39h1<sup>H324L</sup>)、もう 1 つは酵素活性が増強する H320R アミノ酸置換体(Suv39h1<sup>H320R</sup>)である。野生型とこれらの変異体 Suv39h1 のメチル化活性を *in vitro* のヒストンメチル化アッセイにより検討した。その結果、野生型 Suv39h1 において見られたヒ

ストンH3のメチル化活性が、H324Lでは失われていること、H320Rでは野生型のSuv39h1よりも大幅にヒストンメチル化活性が向上していることが確認できた（図7）。

### 3-2 Suv39h1はHP1との相互作用非依存的にペリセントロメア領域へのH3K9me3修飾を触媒する

前述したようにヘテロクロマチンの形成にはヒストンメチル化酵素であるSuv39h/Clr4、そしてヘテロクロマチンタンパク質であるHP1/Swi6が重要な役割を担っていることがわかっていて、マウスにおいてはSuv39hとHP1が複合体を形成し、これらの2つのタンパク質が協奏的に働きヘテロクロマチン領域へH3K9me3修飾を広げていくと考えられている（図5）。この反応モデルにおいてはSuv39hとHP1との間の相互作用が必要である。しかし、これら2つのタンパク質の間の相互作用がヘテロクロマチン形成に必須であるという直接的な証拠は示されていなかった。そこで筆者はSuv39hとHP1との間の相互作用が本当にヘテロクロマチンの形成に必要であるのか検証することとした。

そのために、まずFlagタグをつけたSuv39h1(Flag-Suv39h1)、メチル化活性を欠失したSuv39h1の変異体(Flag-H324L)、そしてHP1との相互作用を欠失したSuv39h1の変異体(Flag-ΔN)の発現ベクターを*Suv39h1/h2*をノックアウトしたES細胞(*Suv39h dn* ES)へトランスフェクションし、その安定発現株を樹立した(図8A)。残念ながら、内在性のSuv39h1のタンパク発現量をウエスタンブロッティングにより検出できるよい抗体が入手できなかったため、内在性一外来性タンパク質の発現量の比較をすることは叶わなかった。なお、上述したメチル化活性が向上している変異体であるH320Rの安定発現株も樹立しようと試みたが、細胞増殖が著しく遅滞するため全く樹立することができなかった。この実験結果は、Suv39h1の過剰発現は細胞周期の遅滞をもたらすという過去の報告と合致した結果となった(78)。Suv39h1が細胞周期の遅滞を引き起こすメカニズムについては

現在のところ明らかではない。

次に筆者は樹立した細胞株におけるペリセントロメア領域の H3K9me3 修飾と HP1、Suv39h1 の局在を免疫染色にて観察し、Suv39h1 と HP1 との間の相互作用のヘテロクロマチン形成への寄与を調べた。ペリセントロメア領域は蛍光色素 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) と親和性の高い AT リッチなメジャーサテライトリピートにより構成されており、さらに凝縮した構造をとっているため、DAPI による染色を行うと濃い点 (DAPI-dense 部位) として観察できる。野生型のマウス ES 細胞においては H3K9me3 修飾と HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の蓄積が DAPI-dense な部位で見られ、*Suv39h dn* ES 細胞においてはこれらの蓄積が DAPI-dense な部位から失われていることが確認できる。(図 8B, C)。そして、Flag-Suv39h1 を発現する *suv39h dn* ES 細胞株においては、H3K9me3 修飾の蓄積及び HP1 の局在化が DAPI-dense 部位において回復した(図 8B, C)。またメチル化酵素活性のない Flag-H324L の安定発現株では DAPI-dense 部位における H3K9me3 修飾の蓄積、HP1 の局在化が回復しないことから、ヘテロクロマチンの形成には Suv39h1 によるヒストンメチル化活性が必須であるという過去の報告を確認した(図 8B, C)(3)。一方、HP1 との相互作用ができない Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株においても DAPI-dense 部位での H3K9me3 修飾の蓄積が回復することが明らかとなった(図 8B)。しかし、興味深いことに HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の DAPI-dense 部位への局在化の回復は、それぞれ多く見積もっても 20% 程度しか回復していなかった(図 8B, C, E)。Flag-Suv39h1、Flag-H324L、そして Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株は 2 クローンずつ観察し、同様の観察結果が得られることを確認した(図 8F, G)。上記細胞株におけるヒストンメチル化修飾の状況は、ウエスタンブロット解析によっても検討した。その結果、*Suv39h dn* ES 細胞における H3K9me3 修飾は、野生型 ES 細胞と比較して、約 50% 程度低減することが示された (図 9 下段)。野生型と *Suv39h dn* ES 細胞を抗 H3K9me3 抗体で免疫染色した際には、染色性において顕著な差が見られたにもかかわらず、ウエスタンブロット解析ではそのような大

きな差は見られなかった。ペリセントロメア領域は非常に凝縮した構造をとっていることに伴い H3K9me3 修飾クロマチンも凝縮しているため、免疫染色においては強いシグナルとして検出されるが、それ以外の領域の H3K9me3 修飾は強く検出されないため、野生型 ES 細胞と *Suv39h* dn ES 細胞株の間で顕著な差が見られるのだらうと推察した。ウェスタンブロット解析により、Flag-Suv39h1 及び、Flag-ΔN を発現する *Suv39h* dn ES 細胞株では、H3K9me3 修飾の総量が回復（あるいは野生型以上に回復）していることも確認でき、免疫染色での観察結果と合致した。一方、Suv39h の発現あるなしは H3K9me2 修飾の総量には影響を与えないことがわかった（図 9 下から 2 段目）。しかし、Flag-Suv39h1 を発現する *Suv39h* dn ES 細胞株においては H3K9me1 修飾の総量が低減することがわかった（図 9 上から 3 段目）。この結果は、Suv39h1 は H3K9me1 修飾を基質として H3K9me3 修飾を加えるという過去の報告に合致する結果であった(79)。Flag-Suv39h1 の安定発現株では H3K9me1 の減少、H3K9me3 の増加が Flag-ΔN の安定発現株と比して顕著に見られた。少なくとも、ペリセントロメア領域の H3K9me3 修飾に関しては、免疫染色の結果、野生型 Suv39h1 と変異型(ΔN)ではほとんど差がなかった。そのため、ペリセントロメア領域以外のクロマチン領域への H3K9me3 修飾付加の機構において野生型 Suv39h1 と ΔN には何らかの差異点があることが考えられた。さらに、上述した細胞株のペリセントロメア領域における HP1β の蓄積、H3K9me3 修飾状況を ChIP-qPCR により検証し、免疫染色と同様の結果が得られた（図 10A, C）。つぎに、Flag-Suv39h1、Flag-H324L、Flag-ΔN の局在化を免疫染色により観察したところ、Flag-Suv39h1、Flag-ΔN はペリセントロメア領域へ局在していることがわかった（図 8C）。Suv39h1 のペリセントロメア局在については、ChIP-qPCR によっても確認された（図 10B）。なお今回樹立した細胞株における内在性の HP1α、β、γ の発現量には変化はなかった（図 11）。これらのデータは、Suv39h1 が HP1 会合非依存的にペリセントロメア領域へ誘導され H3K9me3 修飾を広げることができることを示している。また、これらのデータは HP1 がペリセントロメアヘテロクロマチンへ安定

的に局在化するためには、クロモドメインによる H3K9me3 修飾への結合だけでは十分ではなく、Suv39h1 との相互作用が必要であることを示している。

### 3-3 マウス ES 細胞において Suv39h1 はヘテロクロマチンの形態に影響を与えない

筆者は Suv39h1 による H3K9me3 修飾、そして HP1 の蓄積がペリセントロメアヘテロクロマチンの形態にどの程度影響を与えるかについても調べることにした。まず筆者は上記の細胞株における、細胞 1 個当たりの DAPI-dense 部位の個数と断面積を計算した。その結果、上記の細胞株間では細胞 1 個当たりの DAPI-dense 部位の数と断面積には差がみられないことがわかった (図 12A, B)。また、DAPI-dense 部位の形態を三次元イメージにより観察したが、それぞれの細胞株の間に形態に変化は観察されなかった (図 12C)

DAPI 染色のデータより、上記細胞株の間の違いは見られなかった。そこで、筆者はペリセントロメア領域の凝縮具合を調べるために、上記細胞株についてマイクロコッカス クレアーゼ (MNase) 感受性試験を行った。その結果、それぞれの MNase の濃度における DNA 断片化の合いは、それぞれの細胞株間で有意な差が認められなかった。つまり、上記細胞株の間でのペリセントロメア領域の MNase 感受性に違いはないことがわかった (図 13)。

これらの結果は、マウス ES 細胞においては Suv39h1 はペリセントロメア領域の凝縮には大きな寄与はしていないことを示している。

### 3-4 H3K9me3 の下流に位置する H4K20me3 修飾と ATRX のペリセントロメア領域への蓄積は HP1 依存的である

*Suv39h dn* 細胞ではペリセントロメア領域における H3K9me3 修飾、HP1 の局在化の喪失だけでなく、その下流に位置すると言われている H4K20me3 修飾の喪失や HP1 以外の



ヘテロクロマチンタンパク質の局在が失われていることがわかっている(72, 73, 74, 80,81)。今回の実験により、Suv39h1 によるペリセントロメア領域への H3K9me3 修飾の確立には HP1 との会合ならびに蓄積は必須ではないことがわかった。そこで、本来なら存在するはずの HP1 の蓄積がこれらペリセントロメアヘテロクロマチンの形成においてどのような意義を持っているのかをさらに探るため、Flag-ΔN を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株におけるペリセントロメア領域での、H3K9me3 修飾の下流の因子等についても検討することとした。

まずは、ペリセントロメア領域における H4K20me3 修飾の蓄積について免疫染色によって観察した。野生型の ES 細胞においては DAPI-dense 部位へ H4K20me3 修飾が蓄積しているが、*Suv39h dn* 細胞株においてはその蓄積が喪失していることが観察できた(図 14A, C, D)。一方、Flag-Suv39h1 を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株においてはその蓄積が回復しているが、Flag-H324L の安定発現株では回復が見られなかった(図 14A, C, D)。これは H4K20me3 修飾が Suv39h1 による H3K9me3 修飾の下流に位置していることを示していると矛盾しない。しかし、Flag-ΔN を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株では DAPI-dense 部位における H4K20me3 修飾の回復が全く見られないことがわかった(図 14A, C, D)。H4K20me3 修飾の責任酵素である Suv4-20h のヘテロクロマチン領域への誘導には HP1 との会合が必要であると過去に報告されている(82)。このデータは Flag-ΔN を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株においては HP1 の局在化が失われているために Suv4-20h のペリセントロメア領域への誘導が起らなかったと推察した。

今回、クロモドメインによる H3K9me3 修飾への親和性だけでは、HP1 のヘテロクロマチンへの安定な局在化には不十分であることを示した。そこで HP1 以外で H3K9me3 修飾への親和性のあるドメインをもつタンパク質 ATRX の局在化にどのような影響があるのかを調べた。ATRX は ATPase ドメインを持つタンパク質で、SWI/SNF ファミリーに属するクロマチンリモデリング因子として知られている(83)。また ATRX の持つ ADD ドメインには H3K9me3 修飾への親和性があり、ヘテロクロマチン領域へ局在化する(84)。*Suv39h dn*

細胞株においてはその局在化が失われることから、ATR $\times$  の局在化は Suv39h による H3K9me3 修飾依存的であることがわかっている(84) (図 14B, C, E)。ここで筆者は Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株において ATR $\times$  の局在化が回復するか否かを観察した。その結果、Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株では ATR $\times$  の局在化は回復しないことがわかった(図 14B, C, E)。このデータは ADD ドメインによる H3K9me3 修飾への親和性だけでは ATR $\times$  のペリセントロメアヘテロクロマチンへの安定的な局在化には十分ではないことを示している。そこで、筆者は Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株では ATR $\times$  の局在化が回復しない理由についてもう少し検討することにした。ATR $\times$  は HP1 と相互作用することが知られているが(85)、この相互作用は ATR $\times$  のペリセントロメア領域への局在化には部分的にしか寄与しないことが報告されている(86)。つまり、Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株ではペリセントロメア領域への HP1 の蓄積が減退していることが ATR $\times$  のペリセントロメア非局在化の主要原因ではないと考えられた。ATR $\times$  が H3K9me3 修飾に高親和性を示すには同じ H3N 末テールの H3K4 がメチル化修飾を受けていないことが重要で、H3K4 がジ/トリメチル化修飾を受けると H3K9me3 修飾があっても ATR $\times$  のヒストンへの結合が阻害されることが報告されている (87)。そこで、野生型 ES 細胞、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株における H3K4me2/3 修飾の状況を ChIP-qPCR により調べた。その結果、いずれの細胞においてもペリセントロメア領域では H3K4me2/3 修飾の変化は見られないことがわかった(図 15)。このデータは、H3K4 へメチル化修飾が入っていることが、Flag- $\Delta$ N を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株での、ATR $\times$  のペリセントロメア領域への局在化が回復しない原因ではないことを示唆している。なお、上記の細胞株間において内在性 ATR $\times$  の発現量に差がないことは、ウェスタンブロット解析により確認した(図 16A)。

ATR $\times$  はペリセントロメア領域以外にも、DAXX (別名 death-domain associated protein-6) 陽性の PML 体 (PML body)にも局在していることがわかっている(88)。そこで

筆者は、ATRX と DAXX の局在を免疫染色により観察し、Suv39h1 が ATRX の DAXX 陽性 PML 体への局在に影響を与えるか否か調べた。その結果、野生型 ES 細胞、Suv39h dn ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、Flag-H324L、Flag-ΔN を安定発現する Suv39h dn ES 細胞株のいずれにおいても、DAXX 陽性 PML 体における ATRX の局在は失われなかった(図 16B)。この結果は、ATRX の DAXX 陽性 PML 体への局在化には Suv39h は関与していないことを示している。

### 3-5 Suv39H1 は HP 1 会合・蓄積非依存的に DNA のメチル化を誘導する

ヒストン修飾と DNA のメチル化の 2 つのエピジェネティック修飾は互いに密接な関係にあることがわかっている(図 4)(89)。Suv39h dn 細胞株においては新規メチル化酵素である Dnmt3a、Dnmt3b のペリセントロメア領域への局在化が失われる結果、この領域を構成するメジャーサテライトリピートの DNA メチル化レベルが低下することが報告されている(73)。そこで筆者は今回樹立した細胞株についてペリセントロメア領域の DNA メチル化レベルを調べることにした。ゲノム DNA をメチル化 DNA 感受性制限酵素である *MaeII* で処理したものを電気泳動で分離し、ペリセントロメア領域を構成するメジャーサテライトの DNA 配列をプローブとして用いてサザンブロット解析を行うことにより DNA メチル化の程度を調べた。コントロールとして *Dnmt1*、*Dnmt3a*、*Dnmt3b* のトリプルノックアウト (*Dnmt* TKO) ES 細胞株をおいた。Dnmt TKO ES 細胞株のゲノム DNA にはメチル化シグナルが存在しないため、そのメジャーサテライトリピートは *MaeII* により完全に消化されていることが確認できる(図 17)。そして、野生型 ES 細胞株では主に高分子量の DNA 断片が検出されるのに対し、Suv39h dn ES 細胞株では低分子量の DNA 断片が多く検出された(図 17)。また Flag-Suv39h1、Flag-ΔN の安定発現株においては高分子量の DNA が検出できるが、メチル化活性のない Flag-H324L の安定発現株では Suv39h dn ES 細胞株と変

ならず低分子量の DNA バンドが検出された(図 17)。この結果はメジャーサテライトリピートの高度なメチル化には *Suv39h1* による H3K9me3 修飾が必要であることを示唆している。また *Flag-ΔN* の安定発現株ではペリセントロメア領域への HP1 の蓄積が見られないことから、DNA のメチル化は HP1 会合・蓄積非依存的に *Suv39h1* によって誘起されることを示す結果であった。次に筆者はこれらの細胞株について *Dnmt3a*、*Dnmt3b* の細胞内局在を観察した。*Dnmt3a*、*Dnmt3b* は野生型の ES 細胞株においてはペリセントロメア領域へ局在しているが、*Suv39h dn* ES 細胞株ではこれらの分子の局在化が失われていた(図 18A, B, D, E)。一方、維持メチル化酵素である *Dnmt1* のペリセントロメア局在は *Suv39h dn* ES 細胞株でも失われなかった(図 18C)。これらのデータから、新規メチル化酵素の非局在化が *Suv39h dn* 細胞株における DNA メチル化レベルの低下を引き起こしていると考えられた(73)。そして *Dnmt3a*、*Dnmt3b* のペリセントロメア領域への局在化は *Flag-Suv39h1*、*Flag-ΔN* の安定発現株においては回復していた(図 18A, B, D, E)。この結果は DNA のメチル化レベルの実験結果と合致していた。なお今回樹立した細胞株における内在性の *Dnmt3a*、*Dnmt3b* の発現量には変化はなかった(図 19)。

### 3-6 メジャーサテライトの転写抑制には HP1 が必要である

ペリセントロメア領域は H3K9me3 修飾、H4K20me3 修飾そして DNA メチル化といった転写抑制的なエピジェネティック修飾が蓄積していることが特徴である。しかし、このような抑制的なエピジェネティック修飾が蓄積しているにもかかわらず、ペリセントロメア領域を構成するメジャーサテライトリピートは弱いながらも転写されていることが確認されている(90)。そしてこのメジャーサテライトリピートの転写はマウスの正常な胚発生に必要であることが報告されている(91, 92)。しかし、がん細胞においてはこのメジャーサテライトリピートの異常な転写が見られることから、メジャーサテライトの転写量を正常

なレベルに制御することは正常な細胞活動を維持するために必要であることが推測される(93)。そこで筆者は今回樹立した細胞株についてメジャーサテライトリピートの転写制御が正常に行われているかについて検討した。細胞株から total RNA を抽出し、メジャーサテライトのプロンプを使用し、ノザンブロット解析を行った。その結果、野生型 ES 細胞ではメジャーサテライトの転写は抑制されているが *Dnmt* TKO ES 細胞株、*Suv39h dn* ES 細胞株では転写量の上昇が観察された(図 20A, B)。 *Dnmt* TKO ES 細胞株ではペリセントロメア領域の H3K9me3 修飾の蓄積には影響がないため(94)、*Suv39h dn* ES 細胞株に比べ転写量が低いと考えられる。そして Flag-*Suv39h1* の安定発現株ではメジャーサテライトの転写量が抑制されている一方、Flag-H324L の安定発現株では転写の抑制は見られない(図 20A, B)。これは *Suv39h1* による H3K9me3 修飾が転写抑制には必要であることを示している。しかし、Flag- $\Delta$ N の安定発現株においては不完全な転写抑制しか相補されていないことがわかった(図 20A, B)。

## 第4章 考察

### 4-1 Suv39h1 は HP1 会合・蓄積非依存的にペリセントロメア領域へ H3K9me3 修飾を誘導し維持することができる

ペリセントロメア領域のヘテロクロマチンの形成は Suv39h1 と HP1 との共依存的な反応により行われていると考えられてきた。Suv39h と HP1 には物理的な相互作用が認められること(76, 77)、HP1 のクロモドメインには H3K9me3 修飾への親和性がある(7, 8)という実験事実から、Suv39h が HP1 の足場である H3K9me3 修飾を提供し、HP1 が Suv39h1 をヘテロクロマチン領域へ誘導していくという協奏的な反応モデルが考えられてきた。しかし、Suv39h は HP1 に依存しなければ H3K9me3 修飾をペリセントロメア領域へ加えることができないという直接的な証拠は現在まで示されていなかった。そこで、筆者は Suv39h1 と HP1 との間の相互作用に着目しペリセントロメアヘテロクロマチンの形成について解析を行った。

筆者は Flag タグ付きの Suv39h1、H324L、そして HP1 との相互作用領域を欠いた $\Delta N$ を *Suv39h dn* ES 細胞へトランスフェクションし樹立した安定発現株を用いて、免疫染色によりペリセントロメアヘテロクロマチンを観察した。その結果、HP1 との物理的な相互作用を欠いていても Suv39h1 はペリセントロメア領域へ局在し H3K9me3 修飾の蓄積を行うことがわかった。これまでにヘテロクロマチンが確立された後その維持には HP1 は必須ではないことが報告されている (95, 96)。筆者のデータはこれらの報告を支持し、また新規にヘテロクロマチンを確立する際にも Suv39h と HP1 との相互作用は必要ではないことを示す新しいものであり、これまで提唱されてきたモデルを訂正するものである。

酵母においては Clr4 のクロモドメインは H3K9me2 への親和性と RNA への結合能を有しており、Clr4 と H3K9me2 及び RNA との結合がヘテロクロマチンの確立と維持に必要であることが報告されている(97, 98)。またヒト SUV39H1 のクロモドメインにおいても

H3K9me との親和性があることが最近報告された(99)。これらの報告から、次の仮説が導き出せる。すなわち、Suv39h は自身で加えた H3K9me3 修飾を足場にしてペリセントロメア領域への局在を増強させ、この領域全域に H3K9me3 修飾を蓄積していると推察する。

興味深いことに Flag-ΔN の安定発現株ではペリセントロメア領域へ H3K9me3 修飾が蓄積しているにもかかわらず、HP1 の蓄積の回復がほとんど見られないことがわかった。HP1 のペリセントロメア領域への局在化にはクロモドメインによる H3K9me3 修飾への親和性だけでは十分ではなく、クロモシャドウドメインによる他のタンパク質との相互作用が必要であることが報告されている(100, 101)。また、ショウジョウバエでは、HP1 のクロマチンとの親和性は Su(var)3-9 との相互作用により促進されることが示されている(76)。今回の実験結果と過去の報告を合わせて考えると、HP1 がペリセントロメアヘテロクロマチンへ安定的に局在するためには、そのクロモシャドウドメインにおいて Suv39h と相互作用することが必要であると考えられる。

#### 4-2 HP1 は Suv39h1 の下流に位置する反応を誘起するために必要である

筆者は Suv39h1 が HP1 非依存的にペリセントロメア領域へ H3K9me3 修飾を確立することができることを示した。そこで、H3K9me3 修飾の下流に位置するヒストン修飾や、HP1 以外のクロマチンタンパク質も HP1 非依存的にペリセントロメア領域に蓄積することができるのかという点が疑問となる。そこで、筆者は上述した Flag-ΔN を安定する *Suv39h dn* ES 細胞株のペリセントロメア領域における H4K20me3 修飾、そして ATRX の局在について観察した。

過去の報告で、H4K20me3 修飾の責任酵素である Suv4-20h は、HP1 と相互作用することによりヘテロクロマチン領域へ誘導され、その標的領域へ H4K20me3 修飾を加えることが示されている(82)。筆者は、ペリセントロメア領域への H3K9me3 修飾の蓄積は見られる

が、HP1 の局在化が見られない Flag-ΔN を安定する *Suv39h dn* ES 細胞株においては、H4K20me3 修飾のペリセントロメア領域への蓄積が見られないことを示した。この結果と過去の報告を合わせて考えると、Suv4-20h による H4K20me3 修飾には、H3K9me3 修飾だけでは十分ではなく、従来通り HP1 が必須であるということが言えそうである。

ATRX は N 末端側に ADD ドメインを有しており、H3K9me3 修飾を認識することでヘテロクロマチン領域に局在する。Flag-ΔN を安定する *Suv39h dn* ES 細胞株における ATRX の局在を観察したところ、ペリセントロメア領域に H3K9me3 修飾が蓄積しているにもかかわらず、ATRX の局在は見られないことがわかった。この細胞株では HP1 の局在がペリセントロメアから失われていることから ATRX の局在化は HP1 依存的であることが予想されるが、過去の報告で、ATRX の局在化は HP1 に部分的にしか依存しないことが示されている(87)。また、ADD ドメインが H3K9me3 修飾をもつ H3 に親和性を示すためには同じ H3 の H3K4 がメチル化されていないことが重要で、H3K4 ヘメチル化修飾が加わることで、ATRX の H3 への親和性が低下することが報告されている(87)。そこで、筆者は *Suv39h dn* ES 細胞株と Flag-ΔN を安定する *Suv39h dn* ES 細胞株において H3K4 がメチル化されているため、ATRX の局在化が失われているのではないかと考え、ChIP によりペリセントロメア領域における H3K4 のメチル化レベルを調べた。その結果、調べたすべての細胞株のペリセントロメア領域において H3K4 のメチル化レベルは有意差がないことがわかった。つまり、Flag-ΔN を安定する *Suv39h dn* ES 細胞株のペリセントロメア領域において ATRX の局在化が失われているのは、HP1 の非局在またはメチル化 H3K4 が原因ではないと考えられる。おそらく ATRX は H3K9me3 認識と HP1 との相互作用だけでなく、その他のタンパク質にも依存しながら総合的にペリセントロメア局在を行っており（例えば ES 以外の細胞では MeCP2 との会合が ATRX のペリセントロメア局在に重要であることが分かっている(84)）、Flag-ΔN を発現する *Suv39h dn* ES 細胞株では、HP1 の蓄積の減退に伴い、この仲介タンパク質のペリセントロメア領域への局在も失われているため、H3K9me3 修飾は



回復してもそれだけでは ATRX の局在も回復しないのではないかと、推察している。

#### 4-3 Suv39h1 は HP1 非依存的に DNA のメチル化を誘導することができる

DNA メチル化とヒストン修飾は密接な関連性を有している。DNA メチル化酵素、メチル化 DNA 結合タンパク質、ヒストン修飾酵素そしてヒストン修飾結合タンパク質はお互いに物理的な相互作用があることがわかっている(図 4)。その中で HP1 は Suv39h1 や G9a、ESET といったヒストンメチル化酵素や Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b といった DNA メチル化酵素との相互作用が認められ(47, 50, 61)、ヒストン修飾と DNA メチル化との間の橋渡しの役割を担っていると考えられている。しかし筆者は Flag-ΔN の安定発現株を使用した実験により Suv39h1 が HP1 非依存的に Dnmt3a、Dnmt3b をペリセントロメア領域へ誘導し DNA のメチル化を引き起こすことを示した。一方、G9a と DNA メチル化酵素との間の物理的な相互作用が標的遺伝子座への DNA メチル化酵素の誘導に重要であることが報告されている (42)。これらの事実からヒストン修飾と DNA メチル化との間には HP1 の橋渡しは必須ではないことが示唆される。これまで、Dnmt1 と HP1 が会合しており、HP1 を介した DNA メチル化制御機構があることが示唆されている (102)。今回の結果は、Suv39h1 が HP1 会合・蓄積非依存的に、新規メチル化酵素である Dnmt3a、Dnmt3b をペリセントロメア領域へ誘導しメジャーサテライトリピートへの DNA メチル化を誘起していることを示唆している。

#### 4-4 メジャーサテライトリピートの転写抑制には HP1 が必要である

酵母においては RNA 干渉機構がヘテロクロマチンの確立に重要であることがわかっている(103)。一方、哺乳類細胞においてはヘテロクロマチン形成過程における RNA の役割

は明らかになっていない。しかし、ペリセントロメア領域を構成するメジャーサテライトリピートはH3K9me3修飾やDNAメチル化などの転写抑制に関わるエピジェネティック修飾が蓄積しているにも関わらず転写されていることが確認されている(90)。しかしメジャーサテライトリピートの過剰な転写は発生の阻害を引き起こすことや、がん化と関連があることが報告されており(91, 92, 93)、その転写は適度に抑制する必要があると考えられている。筆者はこのメジャーサテライトの転写について検討した結果、HP1の局在化が見られないFlag-ΔNの安定発現株においては十分な転写抑制が行われていないことがわかった。この結果は、H3K9me3修飾とDNAメチル化だけでは転写抑制には十分ではなく、安定的なHP1の局在化とH3K9me3修飾の下流に位置するヒストン修飾、タンパク質のペリセントロメア領域への蓄積が、メジャーサテライトリピートの転写抑制には必要であることを示唆している。しかし、マウスES細胞におけるESETによる内在性レトロエレメントの転写抑制については、HP1は必須ではない事が報告されている(37)。これらの実験事実より、HP1による転写抑制機構は、作用する遺伝子座により異なるものであるとも考えられる。

#### 4-5 まとめと今後の展開

今回の研究により、マウス染色体のペリセントロメアヘテロクロマチン形成におけるSuv39h1及びHP1の作用機序についての新たな知見を得ることができた。従来提唱されてきたSuv39h1とHP1の共依存的なヘテロクロマチン形成モデルを訂正するものである。また、筆者の研究結果は、少なくともペリセントロメア領域においては、HP1の役割はSuv39h1をこの領域へ誘導することではなく、H3K9me3修飾の下流に位置するヒストン修飾や、ヘテロクロマチンタンパク質をこの領域へ呼び込み、安定的に局在化させ、より転写抑制的で安定なヘテロクロマチンを形成することに重要性があることを示唆するもので

ある(図 21)。しかし、ペリセントロメア以外のヘテロクロマチン領域、特に条件的ヘテロクロマチンにおける抑制性クロマチン状態の確立・拡大には、HP1 の H3K9me3 認識と Suv39h との会合が重要な役割を持っていることは、十分可能性があり、今後の残された課題である。

今回の研究により、ペリセントロメアヘテロクロマチンの形成過程の一部がより明確になったが、未だ疑問の残る点がある。それは Suv39h はどのようなメカニズムにより、H3K9me3 修飾が入っていないペリセントロメア領域へ誘導されそれが確立するか、という点である。Suv39h による H3K9me3 修飾の前段階では、ESET、Prdm3、Prdm16 によるペリセントロメア領域の H3K9me1 修飾が重要であることが最近報告されている(109)。また、転写因子である Pax3、Pax9 はメジャーサテライトリピート配列へ結合し、その転写を抑制しているが、これらの因子は H3K9me3 修飾の上流に位置することが報告されている(79)。そして、分裂酵母においてはヘテロクロマチン形成に RNA 干渉の機構が関与していることがわかっているが、Clr4 自身も RNA への結合能を有しており、この結合能がヘテロクロマチンの形成に重要であることが示されている(97, 98)。これらの報告を合わせて考えると、Suv39h のペリセントロメア領域への誘導には、その上流のヒストン修飾とそれを認識するタンパク質、Pax3・Pax9 のような転写因子、そして RNA の関与が推測される。RNA の関与については、分裂酵母の Clr4 における RNA への結合領域である塩基性の $\alpha$ -ヘリックスが哺乳類のクロモドメインにも保存されていることから、その可能性も十分ありうるだろう。今後、今回の解析結果を元に、Suv39h の上流因子から Suv39h による H3K9me3 修飾に至るまでのさらなる分子メカニズムの解明が進むことを期待したい。

## 図表の説明

### 図1 真核生物のゲノム DNA はヒストンに巻き付き核内に収納されている

真核生物のゲノム DNA は糸巻きの役割を担っているヒストンに巻き付くことによって、秩序だって核内に収納されている。DNA とヒストンの複合体はヌクレオソームと呼ばれ、クロマチン構造の最小単位である。ヌクレオソームは様々なタンパク質や RNA と会合することで、高次なクロマチン構造を形成する。ヒストンは H1、H2A、H2B、H3、H4、の 5 種類があり、そのうち H2A、H2B、H3、H4 はコアヒストンと呼ばれ、それぞれが 2 分子ずつ会合することによって、DNA が巻き付くヒストン八量体を形成する。

### 図2 ヒストン H3 の修飾酵素とリーダータンパク質とそれぞれの修飾の機能

コアヒストンのテールは様々な化学修飾を受けることが知られている。例えばヒストン H3 は図に示すように N 末端から 4 番目、9 番目、そして 27 番目(それぞれ H3K4, H3K9, H3K27)にメチル化、またはアセチル化修飾を受けることがわかっている。それぞれの修飾は特異的な酵素（図中赤枠に示すもの）によって触媒され、読み取り分子（図中の HP1、Chd1、TAF）に認識されることでその機能を発揮する。H3K9 及び H3K27 へのメチル化は転写の抑制を誘導し、H3K4 のメチル化、H3K9 のアセチル化は転写の活性化を誘導する。

### 図3 DNA メチル化は転写抑制に関わるエピジェネティックマークである

哺乳類細胞においてはシトシン残基の 5 位の炭素にメチル基が付加されることが知られている (A)。ゲノム中では CpG 配列のシトシンにメチル基の付加が起こる。DNA のメチル化の責任酵素は、複製に伴い生じるヘミメチル化 DNA を基質にする維持メチル化酵素 Dnmt1 と、新規にメチル基を加える新規(*de novo*)メチル化酵素(Dnmt3a、Dnmt3b)が存在する(B)。DNA のメチル化は MeCP2 や MBD などといった読み取りタンパク質に認識され

る。これらのタンパク質は、その他の転写抑制的なヒストン修飾関連因子を誘導し、クロマチン構造の変化をもたらすことで、結果、転写抑制機能を発揮しているのであろうと考えられている。

#### 図4 ヒストン修飾関連因子と DNA メチル化関連因子は互いに相互作用している

H3K9 のメチル化などのヒストン修飾と、DNA のメチル化はともに遺伝子発現制御に寄与していることがわかっている。そしてこれまでに、転写抑制的に働くヒストン修飾の関連因子と、DNA メチル化の関連因子は互いに相互作用し合っていることが多く報告されている。H3K9 のメチル化酵素 (Suv39h1、G9a、Setdb1)、DNA メチル化酵素 (Dnmt1/3a/3b)、メチル化ヒストン結合タンパク質 (HP1、ATRX)、そしてメチル化 DNA 結合タンパク質の間 (MBD1、MBD2、MeCP2) で、相互作用することが報告されているものを図に示す。それぞれの因子を結ぶ線は相互作用をすることを表す (29~60)。

#### 図5 提唱されているペリセントロメアヘテロクロマチンの形成機構のモデル

マウス染色体の模式図を示す。マウス染色体のセントロメア領域 (図中黄色の領域) の近傍に位置するペリセントロメア領域 (図中青色の領域) は、恒常的にヘテロクロマチン構造をとっている領域である (構成的ヘテロクロマチン)。Suv39h の蓄積とこれが触媒する H3K9me3 修飾の蓄積、そして H3K9me3 修飾に結合する HP1 の蓄積が、ペリセントロメア領域の特徴として観察される。ペリセントロメアヘテロクロマチンの形成については、H3K9me3 修飾を認識した HP1 が Suv39h1 をペリセントロメア領域へ誘導し、続いて Suv39h が近傍のヒストンへ H3K9me3 修飾を加えることによって、Suv39h の局在、H3K9me3 修飾、HP1 の局在がペリセントロメア領域全域に拡大する、という反応モデルが提唱されてきた。

#### 図6 Suv39h1 はその N 末端領域において HP1 と結合する

(A) タグ付きタンパク質の模式図である。N 末端に Flag タグを融合させた野生型 Suv39h1 (Flag-Suv39h1)、N 末端の 1 ~ 41 アミノ酸残基を欠失させた変異型 Suv39h1 (Flag-ΔN)、C 末端に myc タグを付加させた HP1α、β、γ (HP1α/β/γ-myc) の模式図を示す。(B) 図に示した組み合わせで、発現ベクターをトランスフェクションした HEK293T 細胞株の細胞抽出液を使用して、免疫沈降法-ウエスタンブロッティング法により Suv39h1 および HP1 の間の相互作用を観察した。その結果、抗 Flag 抗体を使用して免疫沈降すると、Flag-Suv39h1 とともに HP1α/β/γ-myc も共沈降する。逆に、抗 myc 抗体を使用すると、HP1α/β/γ-myc とともに Flag-Suv39h1 も共沈降する。しかし、Flag-ΔN と HP1α/β/γ-myc の間では、これらの共沈降反応が見られなかった。

#### 図7 Suv39h1 はその SET ドメインにおいてヒストン H3 をメチル化する

Flag タグを N 末端に融合させた野生型 Suv39h1 と、SET ドメインへアミノ酸置換変異を導入した 2 種類の変異型 Suv39h1 (Suv39h1<sup>H324L</sup>(H324L)、Suv39h1<sup>H320R</sup>(H320R)) をトランスフェクションした HEK293T 細胞株の細胞抽出液から精製した Flag-Suv39h1、Flag-H324L、Flag-H320R のメチル化活性を、ヒストンメチル化アッセイにより調べた。ネガティブコントロールとして、何もトランスフェクションしていない細胞株の抽出液を使用して精製実験を行ったサンプルを置いた。その結果、Flag-Suv39h1 と反応させたヒストン H3 にメチル基(<sup>14</sup>C)が転位されることがわかった。しかし、Flag-H324L と反応させた H3 にはメチル基(<sup>14</sup>C)の転位がほとんど見られない。一方、Flag-H320R と反応させた H3 は、Flag-Suv39h1 と反応させた時と比較して、顕著にメチル基(<sup>14</sup>C)の取り込みが向上していることがわかった。

#### 図8 Suv39h1 は HP1 非依存的にペリセントロメア領域へ H3K9me3 修飾を拡大するこ

とができる

(A) *Suv39h1/2* double null (*Suv39h dn*) ES 細胞株へ、Flag-Suv39h1、Flag-H324L、そして Flag-ΔN の発現ベクター (pCAG-IRESpuro) をトランスフェクションした後にピュアロマイシンを用いて薬剤選択を行い、安定的に Flag タグ付きのタンパク質が発現している細胞株を樹立した。これらの細胞株における Flag-Suv39h1、Flag-H324L、そして Flag-ΔN の発現量を、抗 Flag 抗体を使用したウェスタンブロッティングにより調べた。図中で#1 と#2 が付されている細胞株を使用して、以下の実験に使用した。なお、#2 の細胞株についての実験結果は図 8F, G、図 14D, E、図 18D, E において免疫染色の結果だけを示す。

(B-D)野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株を、図に示す抗原に対する抗体で免疫染色した。観察した抗原は H3K9me3 (赤)、HP1α (赤)、HP1β (緑)、HP1γ (緑)、そして Flag (赤) である。また DNA は DAPI (青) により染色した。(D) 30細胞のペリセントロメア領域(DAPI-dense 部位)における抗原のシグナル強度を DAPI のシグナル強度で割った値をグラフ化したものである。シグナル強度は ImageJ により解析した。(E, F)A、B で示した抗原に対する抗体で染色した複数の細胞の染色図である。また、Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株については、それぞれ 2 つのクローンの染色図を示す。

## 図 9 Suv39h1 は HP1 非依存的に H3K9me3 修飾の蓄積を引き起こす

野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株におけるヒストン H3 のモノ、ジ、トリメチル修飾状態をウェスタンブロット解析により調べた。

## 図 10 Suv39h1 のペリセントロメア領域への局在化と H3K9me3 修飾の蓄積は HP1 非

## 依存的に起こる

野生型 ES 細胞株(TT2)、 *Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株のペリセントロメア領域（メジャーサテライトリピート）と、比較対象である GAPDH のプロモーター領域における H3K9me3 修飾 (A)、Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN の局在(B)、及び HP1βの蓄積 (C) を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により調べた。

### 図 1 1 Suv39h は HP1 の発現量に影響を与えない

野生型 ES 細胞株(TT2)、 *Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株における HP1a、b、g の発現量及び Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN の発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとしてα-Tubulin の発現量を示した。

### 図 1 2 マウス ES 細胞株において Suv39h は染色体中心の形態に影響を及ぼさない

野生型 ES 細胞株(TT2)、 *Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株を DAPI により染色し、1 細胞あたりの DAPI-dense 部位の数を計数した(A)(n=30)。また一つの DAPI-dense 部位の面積(pixel)を ImageJ を使用して計算した(n=30)(B)。そして、徐々に焦点をずらしながら撮影をし、一つの細胞の核を約 25 枚の写真に収めた。そしてこれらの写真を重ね合わせることによって、三次元イメージを取得した。このイメージの X-Z 及び X-Y 方向から見た画像を示す(C)。

### 図 1 3 Suv39h はマウス ES 細胞においてヘテロクロマチンの凝縮には寄与しない

野生型 ES 細胞株(TT2)、 *Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株を MNase(0~20 unit)で処理し、ペリセントロメア領域



(メジャーサテライトリピート)の断片化の進行度(MNase 耐性)を、メジャーサテライトの DNA プローブを使用してサザンブロッティングにより調べた。

#### 図 1 4 H3K9me3 の下流に位置する H4K20me3 修飾と ATRX のペリセントロメア領域への蓄積は HP1 依存的である

(A、B)野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株を、図に示す抗原に対する抗体で免疫染色した。観察した抗原は H4K20me3 (赤)、HP1β (緑)、ATRX (緑)、そして H3K9me3 (赤)である。また DNA は DAPI (青) により染色した。(C) 30 細胞のペリセントロメア領域 (DAPI-dense 部位)における抗原のシグナル強度を DAPI のシグナル強度で割った値をグラフ化したものである。シグナル強度は ImageJ により解析した。(D,E)A、B で示した抗原に対する抗体で染色した複数の細胞の染色図である。また、Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株については、それぞれ 2 つのクローンの染色図を示す。(D) 野生型 ES 細胞株(TT2)と *Suv39h dn* ES 細胞株を H3K9me3 修飾(赤)、Dnmt1 (緑) に対する抗体を用いて染色した。

#### 図 1 5 Suv39h はペリセントロメア領域の H3K4 のメチル化状態には影響を与えない

野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株のペリセントロメア領域 (メジャーサテライトリピート)(A)と、比較対象である GAPDH のプロモーター領域(B)における H3K4me2、H3K4me3 修飾の蓄積度合いを、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により調べた。

#### 図 1 6 Suv39h は ATRX の発現量と DAXX 陽性 PML 体への局在には影響を与えない

(A)野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、

Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株における ATRX の発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとしてα-Tubulin の発現量を示した。

(B) 野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株における ATRX(緑)、DAXX (赤) の局在を免疫染色により調べた。この時 DNA は DAPI (青) で染色した。

#### 図 1 7 Suv39h1 は HP1 非依存的にペリセントロメア領域における DNA のメチル化を誘起できる

野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株のゲノム DNA をメチル化 DNA 感受性制限酵素 *MaeII* により消化し、メジャーサテライトリピートの断片化を、メジャーサテライトの DNA プローブを使用してサザンブロッティングにより調べた。

#### 図 1 8 Suv39h1 は HP1 非依存的に Dnmt3a/b をペリセントロメア領域に誘導することができる

(A,B)野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株を、図に示す抗原に対する抗体で免疫染色した。観察した抗原は Dnmt3a (赤)、Dnmt3b (赤)、そして HP1β (緑) である。また DNA は DAPI (青) により染色した。(C) 30 細胞のペリセントロメア領域(DAPI-dense 部位)における抗原のシグナル強度を DAPI のシグナル強度で割った値をグラフ化したものである。シグナル強度は ImageJ により解析した。(D,E)A、B で示した抗原に対する抗体で染色した複数の細胞の染色図である。また、Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株については、それぞれ 2 つのクローンの染色図を示す。

#### 図 1 9 Suv39h は Dnmt3a/b の発現量には影響を与えない

野生型 ES 細胞株(TT2)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株における Dnmt3a、Dnmt3b の発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとして $\alpha$ -Tublin の発現量を示した。

#### 図 2 0 メジャーサテライトリピートの転写抑制には HP1 が必要である

(A)野生型 ES 細胞株(TT2)、*Dnmt1/3a/3b* のトリプルノックアウト細胞株(Dnmt TKO)、*Suv39h dn* ES 細胞株、そして Flag-Suv39h1、FlagH324L、Flag-ΔN を安定発現する *Suv39h dn* ES 細胞株の全 RNA を抽出し、メジャーサテライトの DNA プローブを用いてノザンブロッティングによりメジャーサテライトの転写量を調べた。(B)ノザンブロッティングのシグナルを ImageJ により解析し定量化した。ノザンブロッティングは 3 回行いその平均値を示す。(\* P<0.05)

#### 図 2 1 ペリセントロメアヘテロクロマチン形成の分子モデル

(A) 野生型のマウス ES 細胞において、Suv39h はペリセントロメア領域に、自ら触媒した H3K9me3 修飾に結合することによって局在する。HP1 は Suv39h が加えた H3K9me3 修飾と、Suv39h と結合することにより、ペリセントロメア領域に安定的に局在する。そして、Suv4-20h や ATRX といったペリセントロメアタンパク質は、HP1 もしくは H3K9me3/K4me0 と相互作用することにより、ペリセントロメア領域に局在する。そして、Suv4-20h によってペリセントロメア領域へ H4K20me3 修飾が蓄積される。Suv39h は Dnmt3a/b をペリセントロメア領域へ誘導することで、メジャーサテライトリピートへの DNA のメチル化を引き起こす。このように、様々なタンパク質、エピジェネティックマークが集積したペリセントロメア領域は転写抑制的なヘテロクロマチン構造を取ることによ

って、メジャーサテライトリピートの転写が抑えられている。(B) *Suv39h* dn ES 細胞株においては、*Suv39h* による H3K9me3 修飾の蓄積が起こらないため、HP1、*Suv4-20h*、ATRX そして *Dnmt3a/b* のペリセントロメア領域への局在が失われる。*Suv4-20h* そして *Dnmt3a/b* の局在化が起こらないため、ペリセントロメア領域の H4K20me3 修飾、DNA のメチル化といったエピジェネティックマークの蓄積は顕著に低下する。そのため、メジャーサテライトリピートの転写は抑制されず、活性化する。(C) *Suv39h1ΔN* を発現する *Suv39h* dn ES 細胞株のペリセントロメア領域においては、 $\Delta N$  の局在化と H3K9me3 修飾の蓄積は起こる。しかし、HP1 の局在化には *Suv39h* との相互作用が必要なため、H3K9me3 修飾の蓄積の回復が見られるにも関わらず、HP1 のペリセントロメア領域への局在化は大幅に低減する。そして、*Suv4-20h*、H4K20me3 修飾、ATRX のペリセントロメア領域への蓄積は、HP1 の蓄積が失われているために、回復しない。しかし、*Dnmt3a/b* は HP1 非依存的に *Suv39h* によりペリセントロメア領域へ誘導されるため、メジャーサテライトリピートの DNA メチル化レベルは回復する。このように、*Suv39h1ΔN* を発現する *Suv39h* dn ES 細胞株のペリセントロメア領域においては、ヘテロクロマチンの形成が不完全なため、メジャーサテライトリピートの転写は完全に抑制されていない。

#### 表1 ヒストン H3 及び H4 のメチル化修飾の一覧表

ヒストン H3 及び H4 のメチル化修飾を受けるリジン又はアルギニン残基と、その残基へメチル化修飾を行うヒストンメチル化酵素の一覧を示す。また、それぞれのメチル化修飾がもたらす細胞機能を示す。

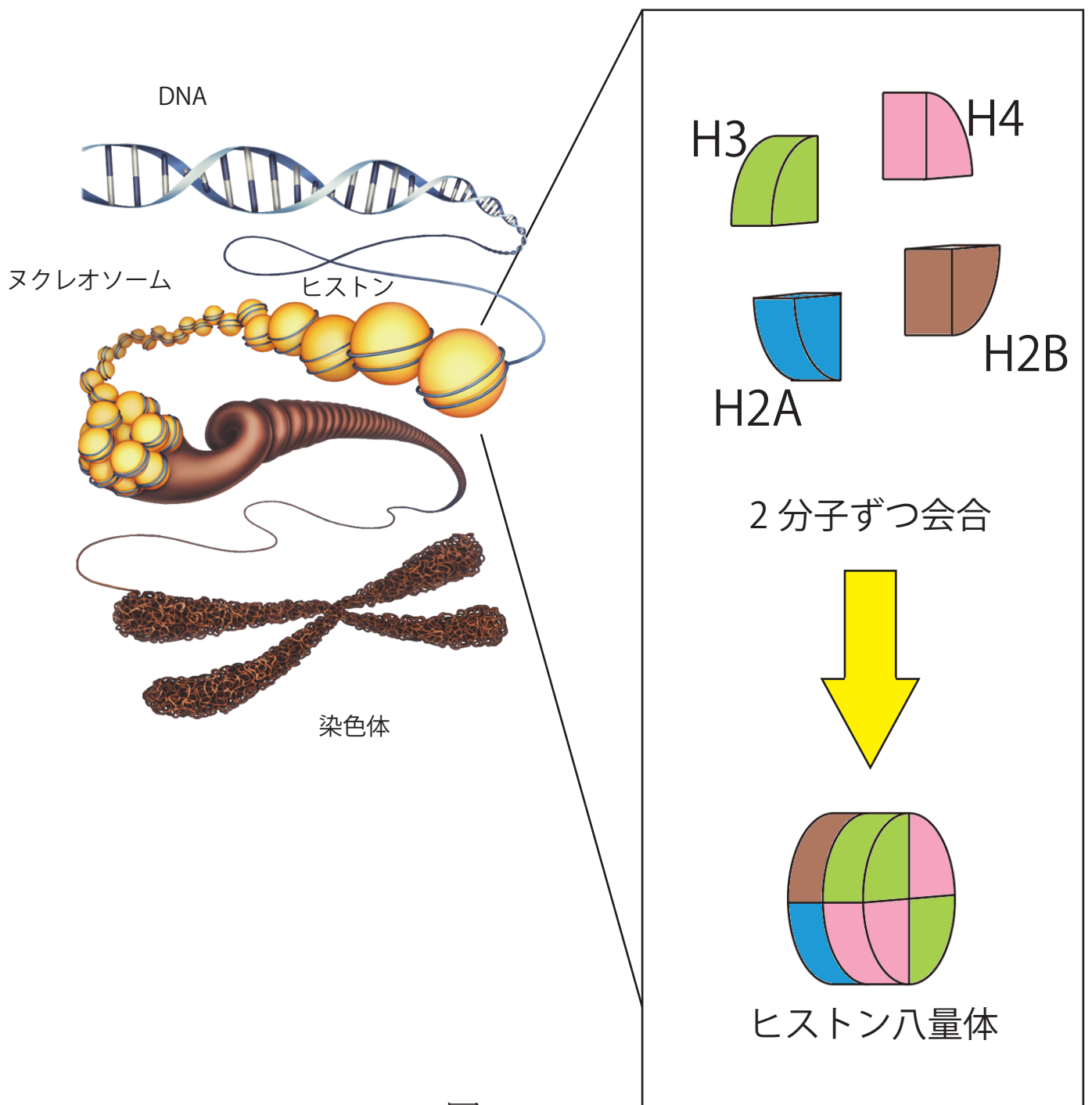


図 1

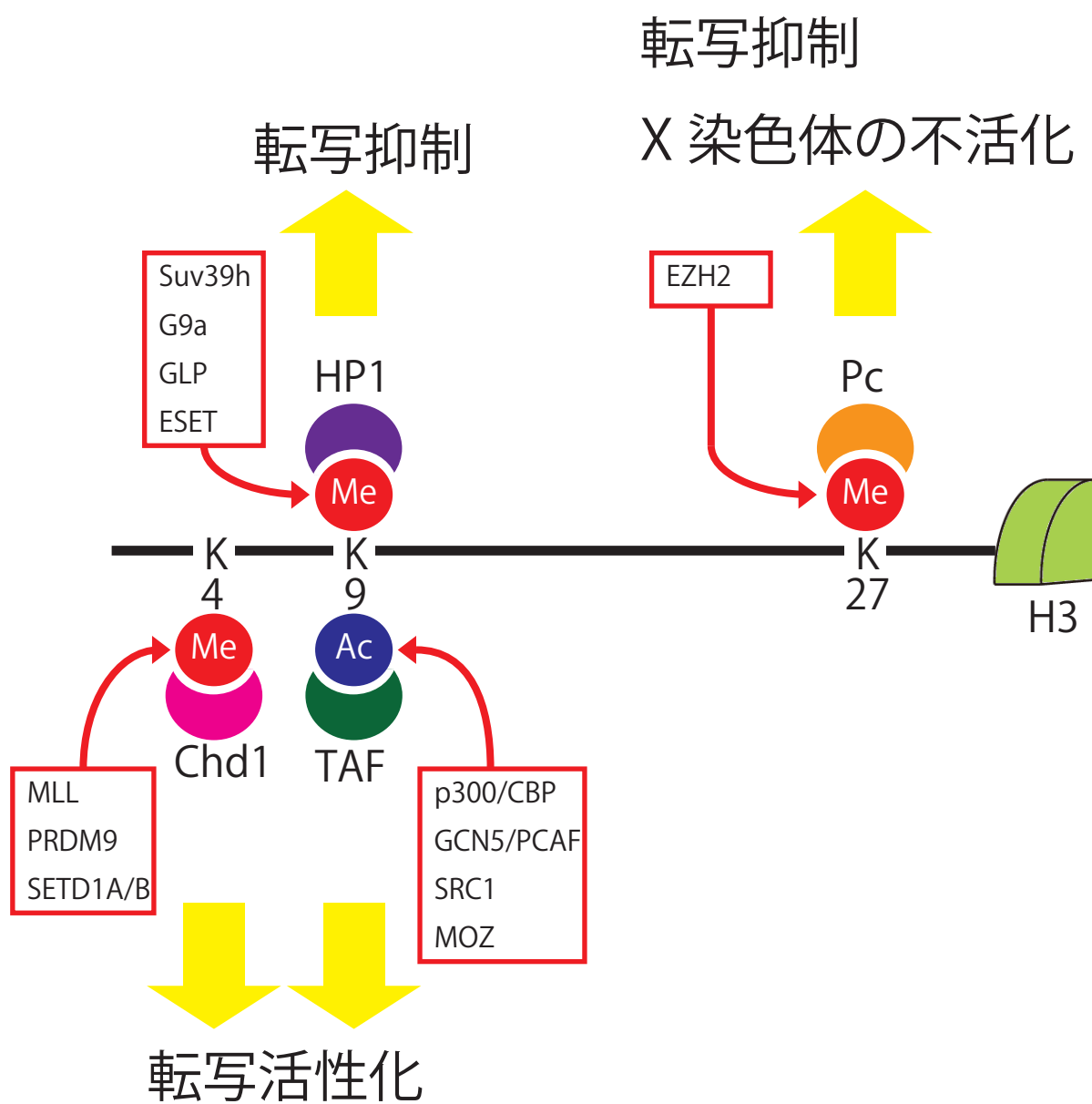


図 2

参考文献				
H3	K4	Set1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	受動的ユークロマチン (di-Me)	12
		Set7/9 (vertebrates)	転写活性化 (tri-Me)	13
		MLL, ALL-1	転写活性化	14, 15
		Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	転写活性化	16
	R8	PRMT5	転写抑制	17
	K9	Suv39h,Clr4( <i>S. cerevisiae</i> )	転写抑制 (Me3)	9, 18
		G9a	転写抑制、 インプリンティング	19
		SETDB1	転写抑制 (Me3)	7
		Dim-5 ( <i>N.crassa</i> ) Kryptonite ( <i>A. thaliana</i> )	DNAメチル化 (Me3)	20, 21
		Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	転写活性化	22
	R17	CARM1	転写活性化	23
	K27	Ezh2	転写抑制 X染色体不活性化	8
		G9a	転写抑制	19
	K36	Set2	転写活性化 (elongation)	24
	K79	Dot1	ユークロマチン	25
			転写活性化 (elongation)	26
			チェックポイント反応	27
H4	Arg3	PRMT1	転写活性化	28
		PRMT5	転写抑制	17
	Lys20	PR-Set7	転写抑制 (mono-Me)	29
		Suv4-20h	ヘテロクロマチン (tri-Me)	30
		Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	転写活性化	16
		Set9 ( <i>S. pombe</i> )	チェックポイント反応	31
	Lys59	unknown	転写抑制	32

表 1

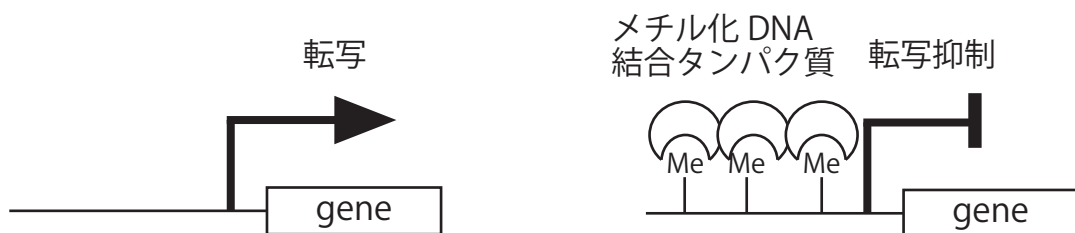
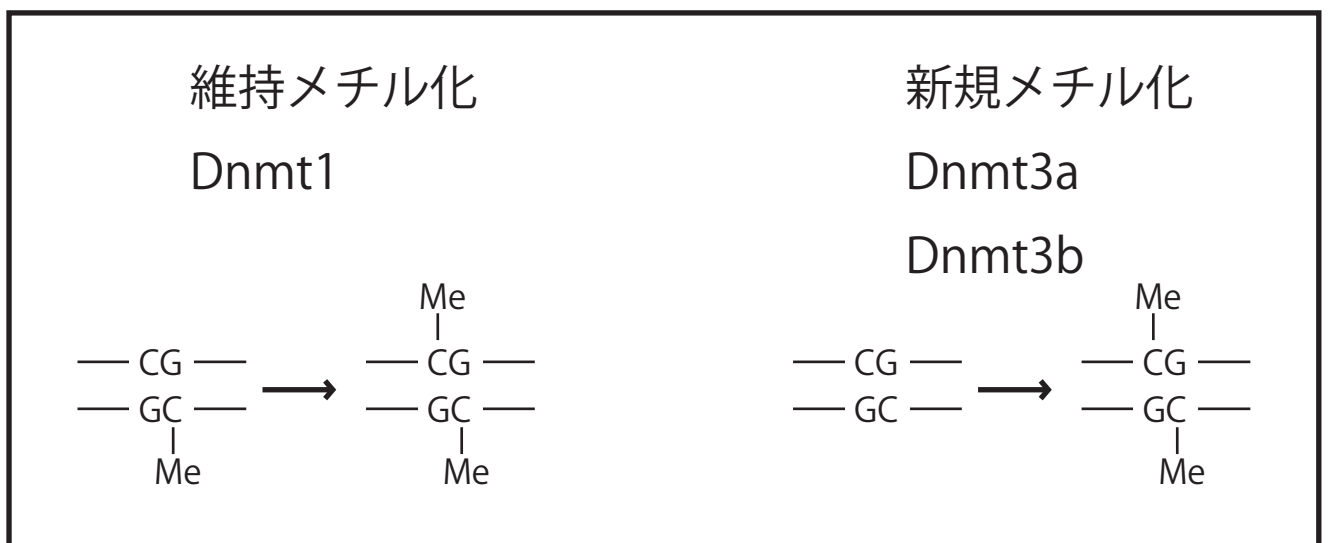
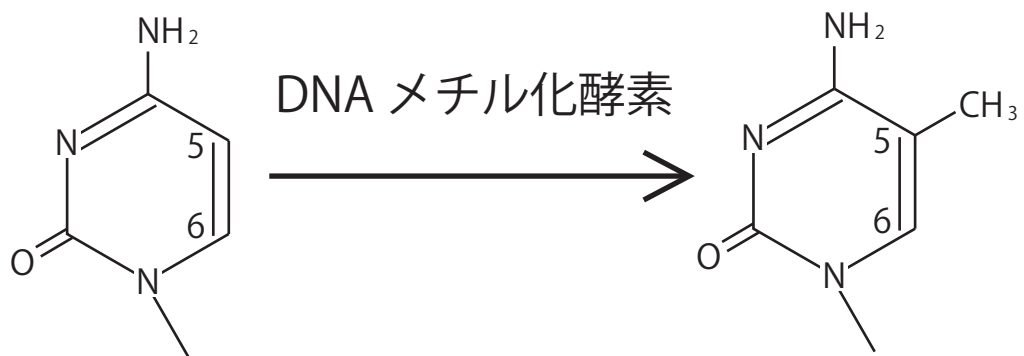


図 3



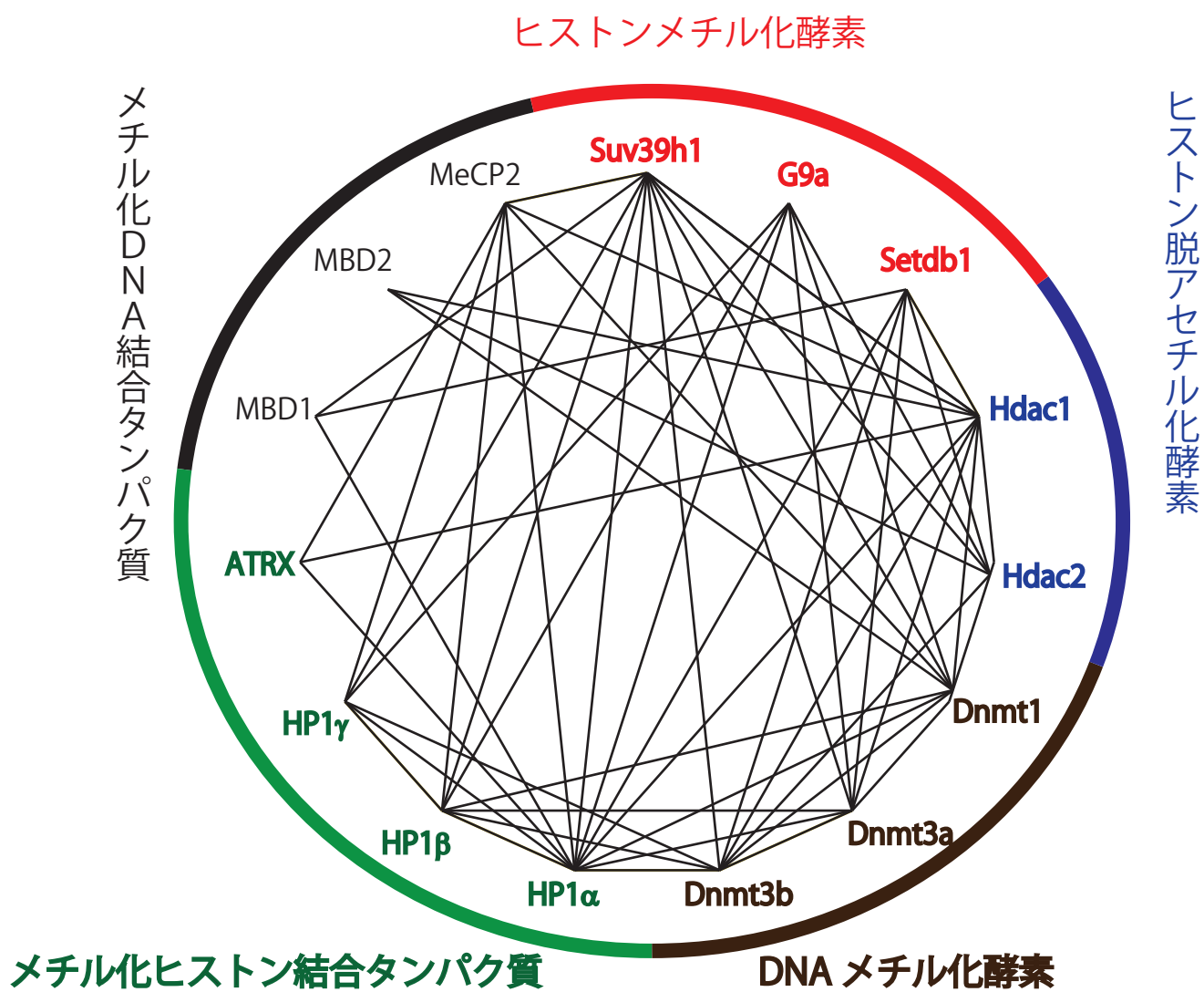


図 4

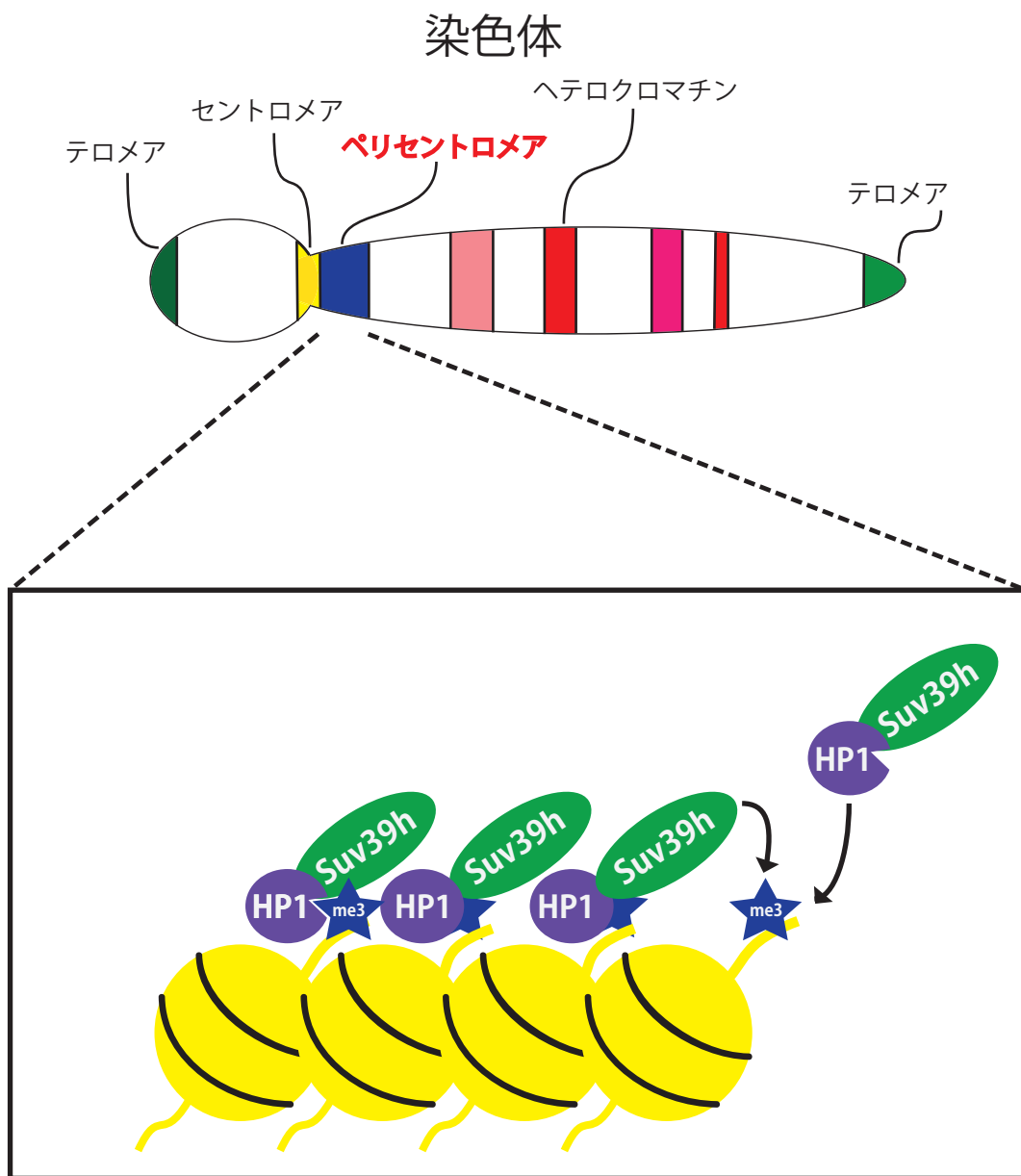


図 5

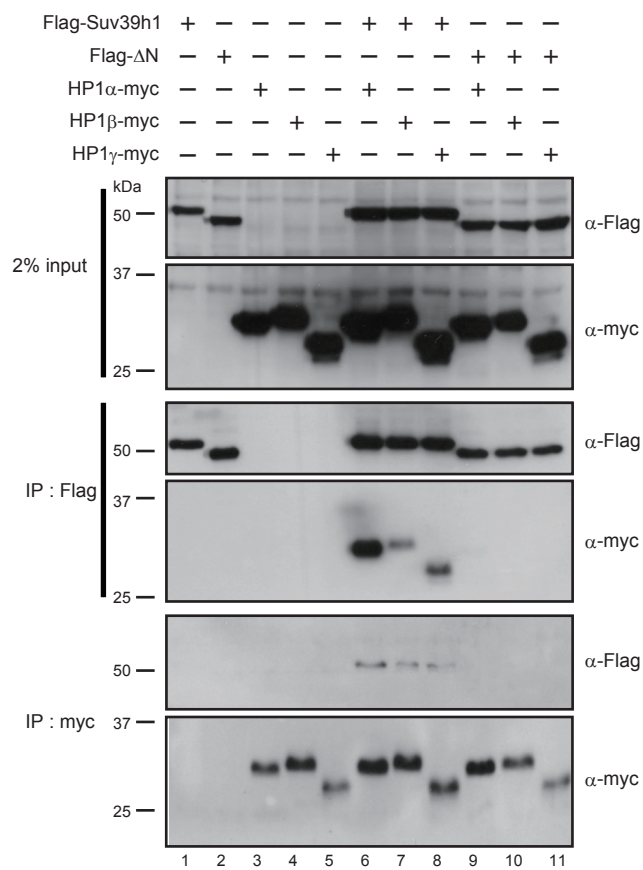
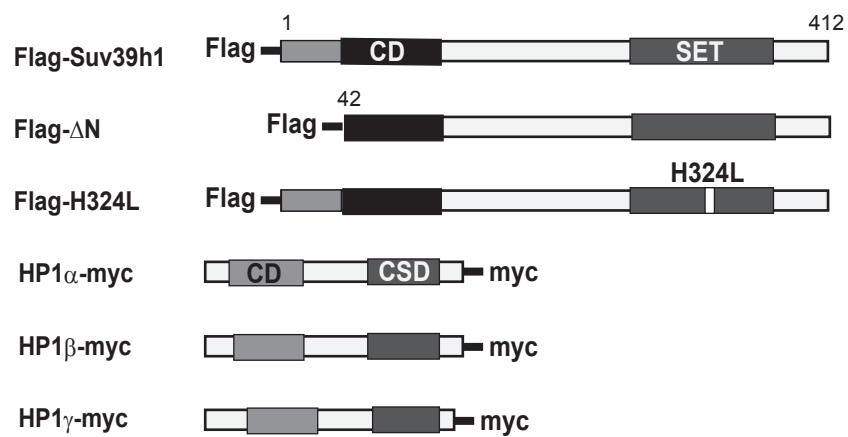


図 6

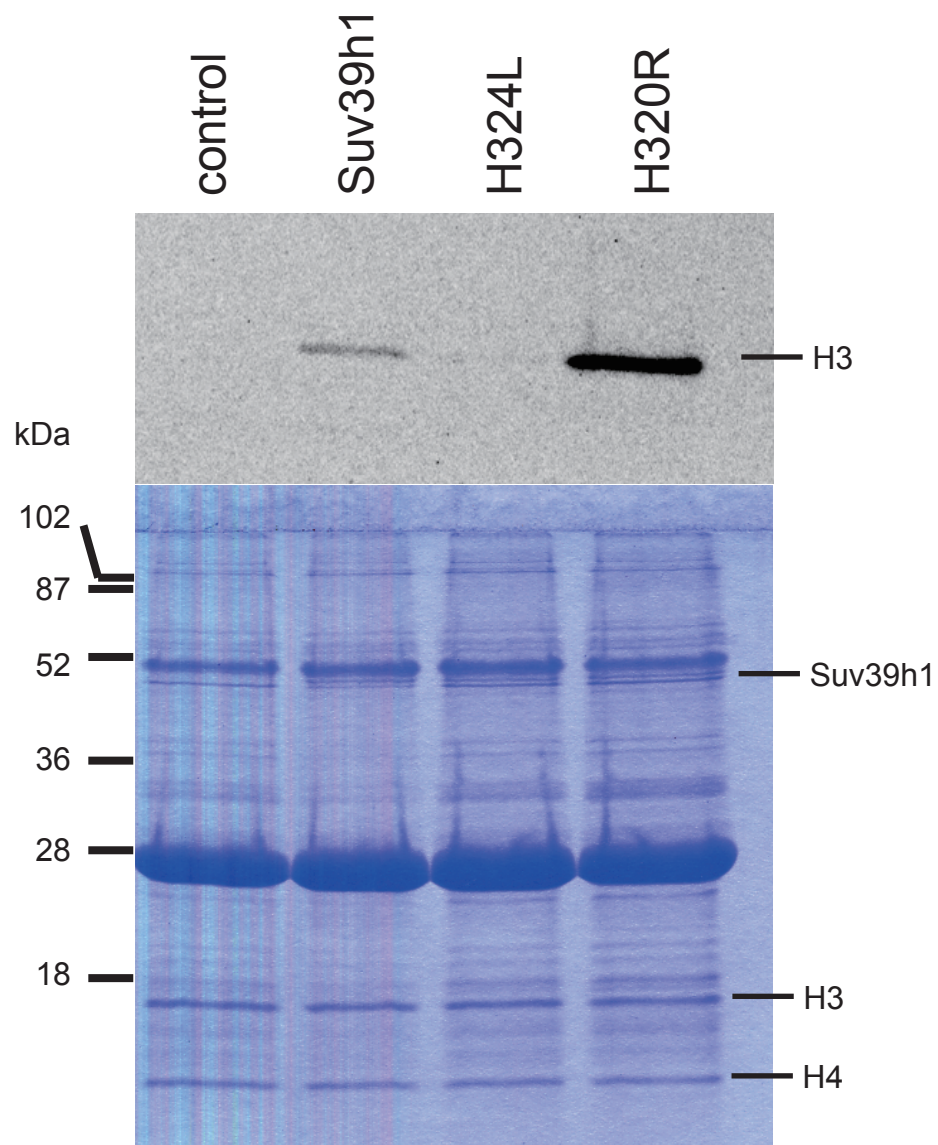


图 7

A

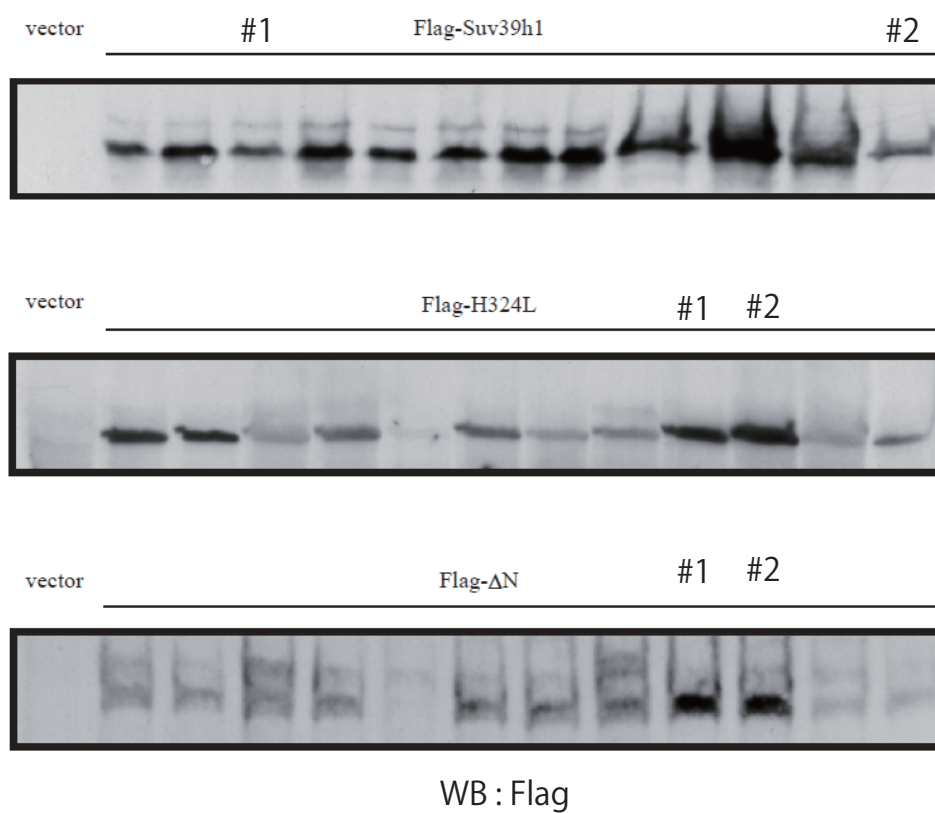


図 8

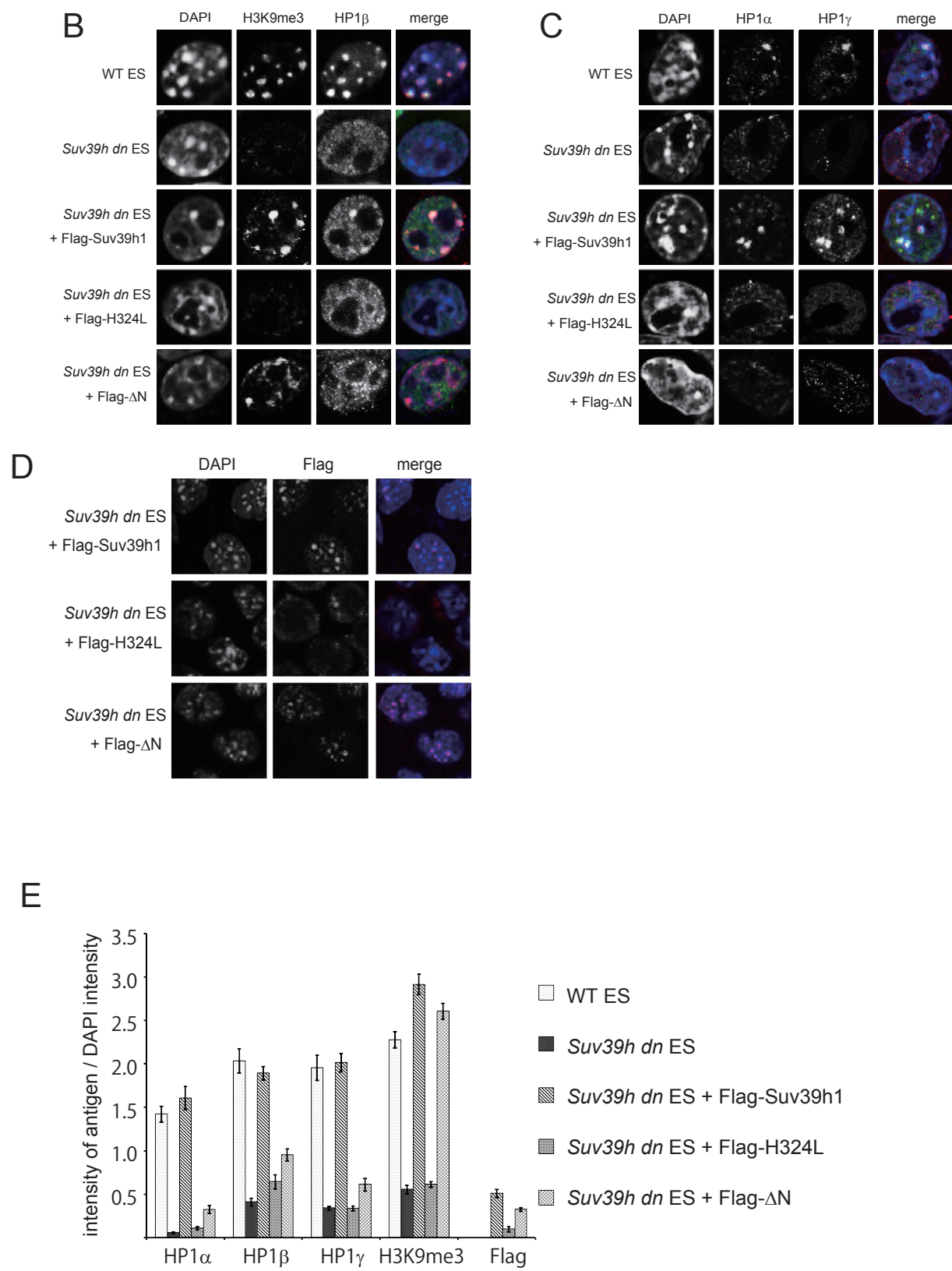
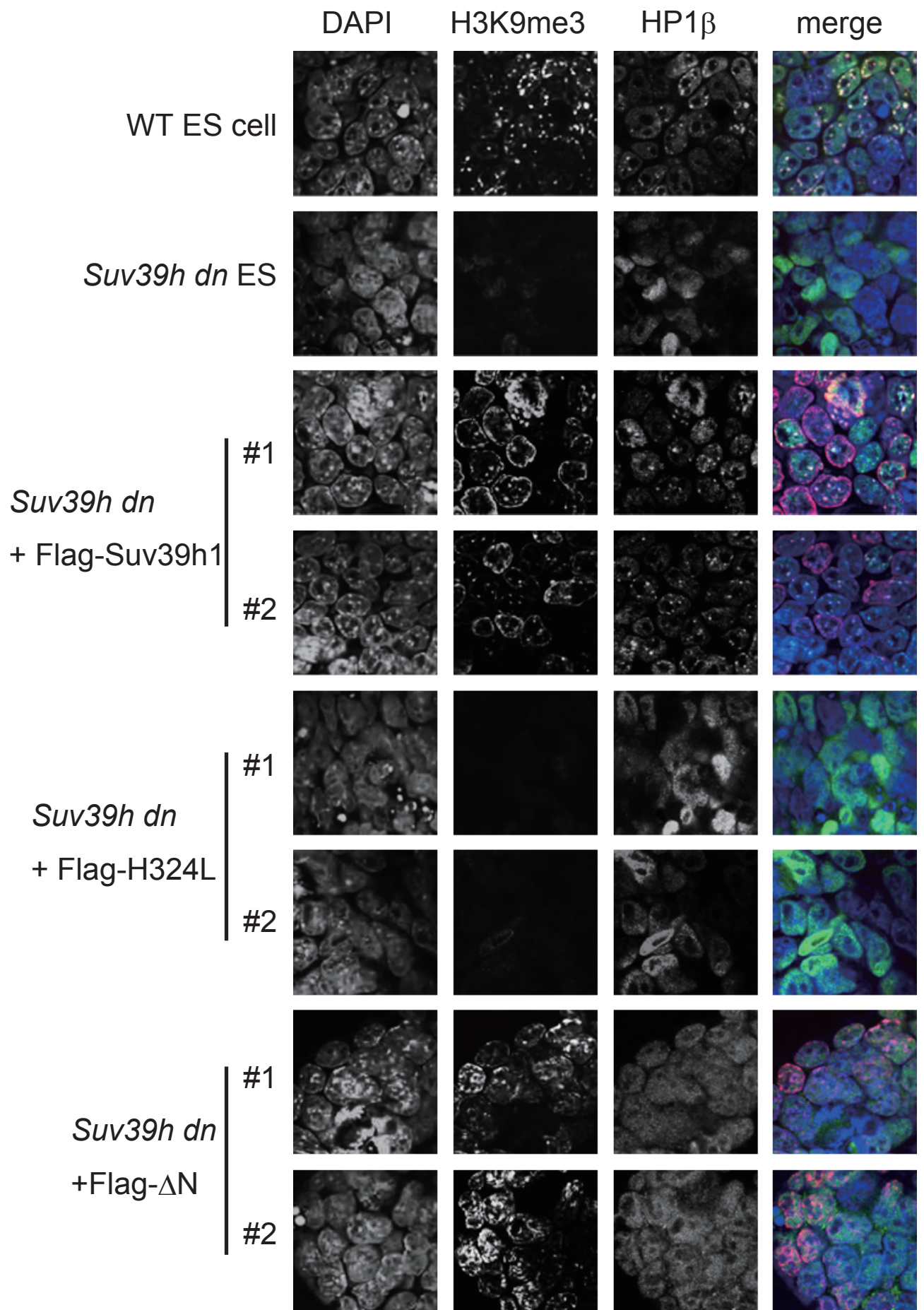


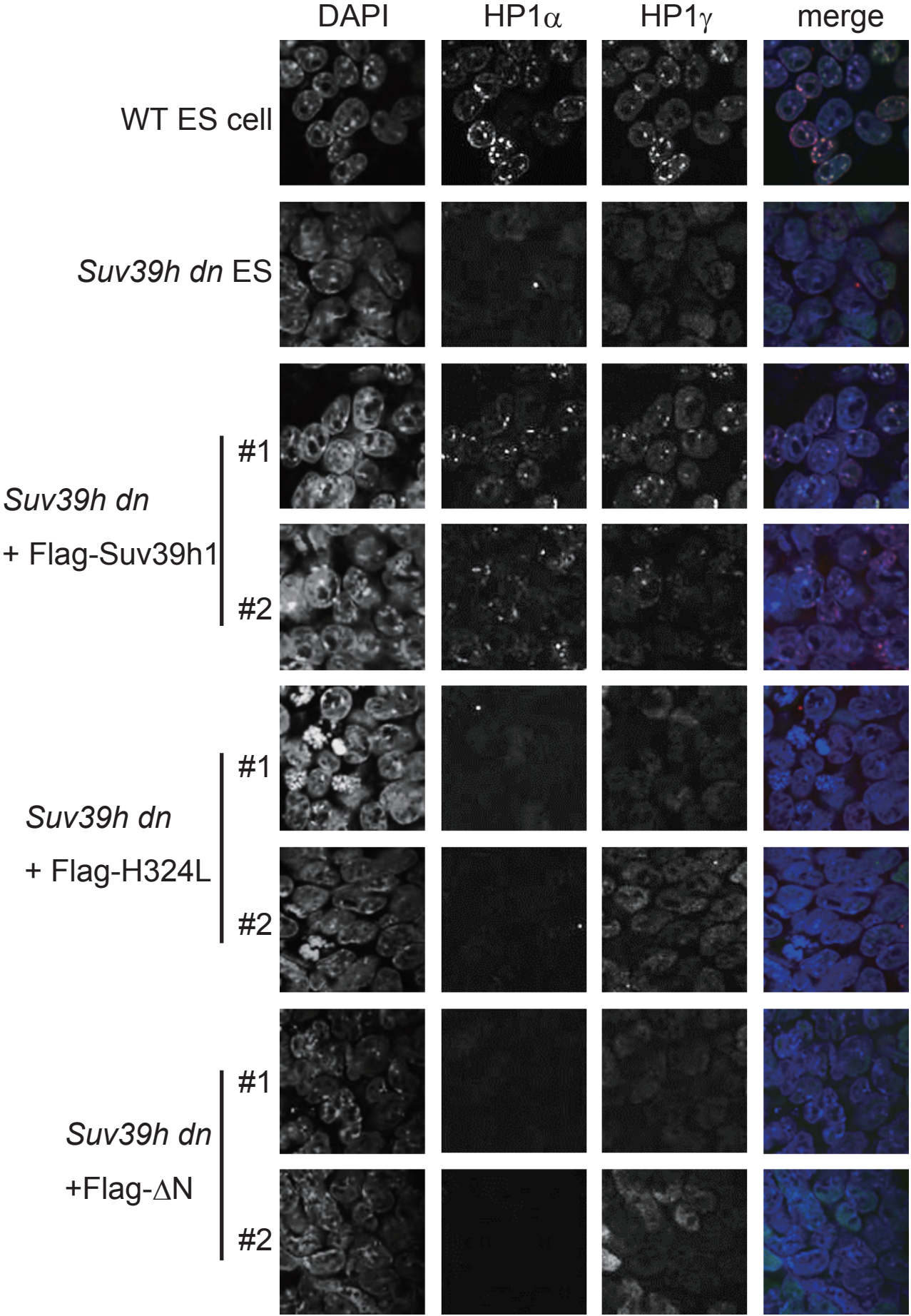
图 8



F



G





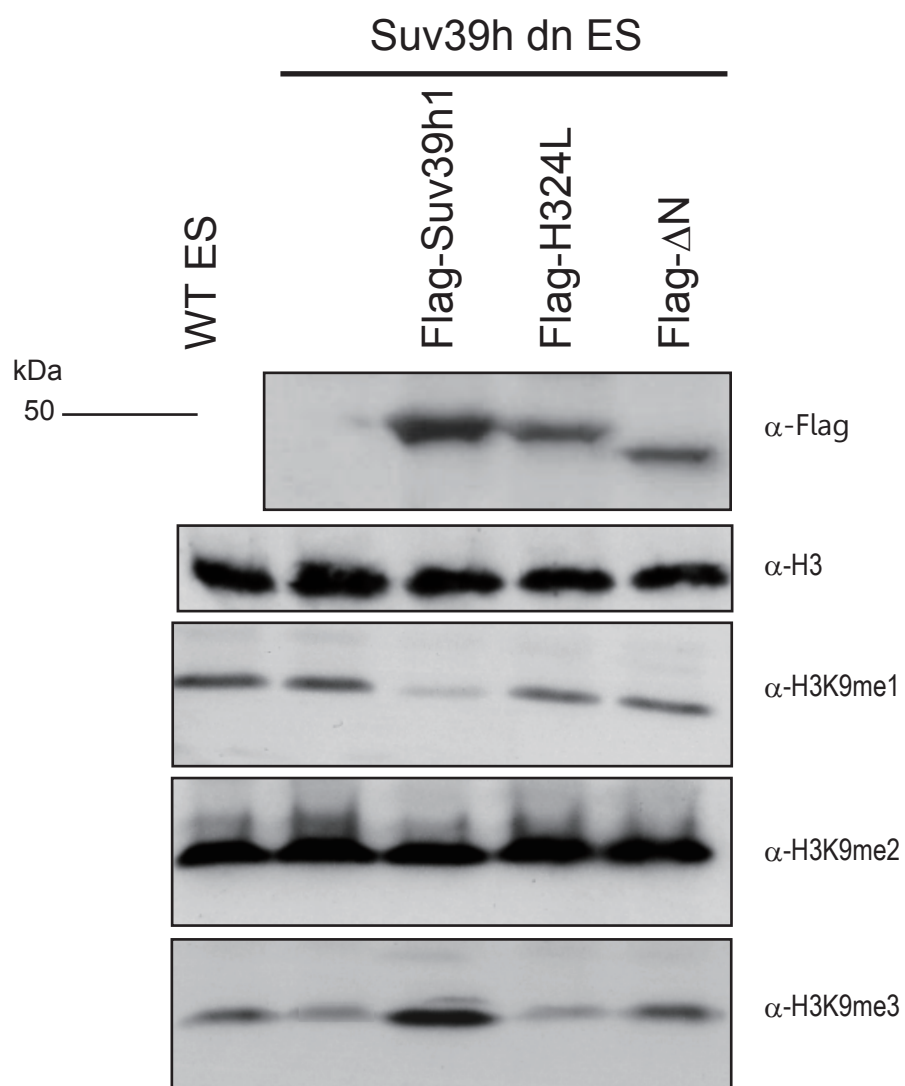
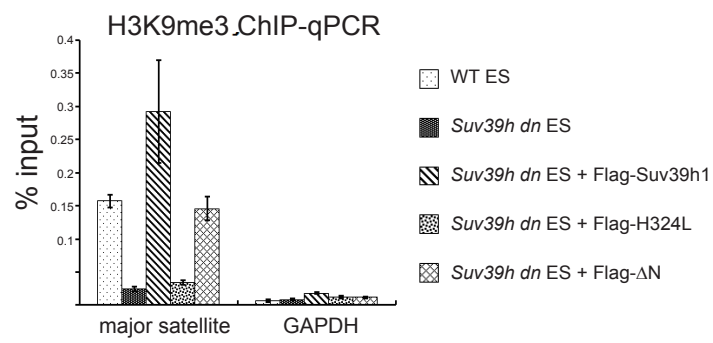
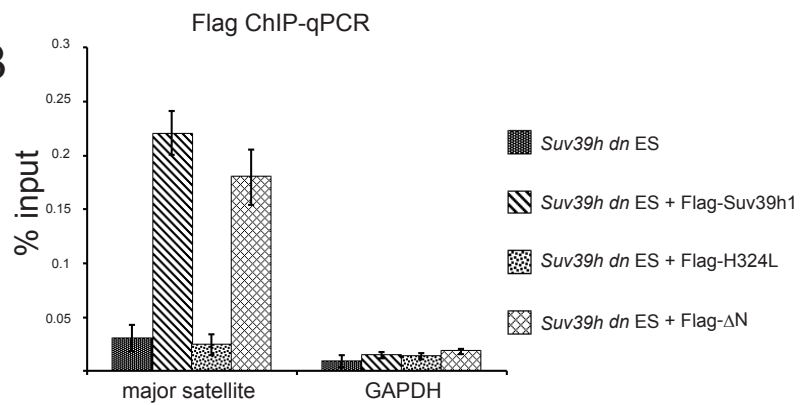


图 9

A



B



C

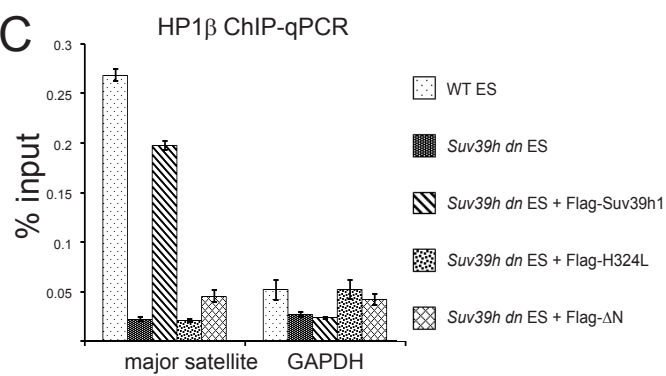


Figure 10

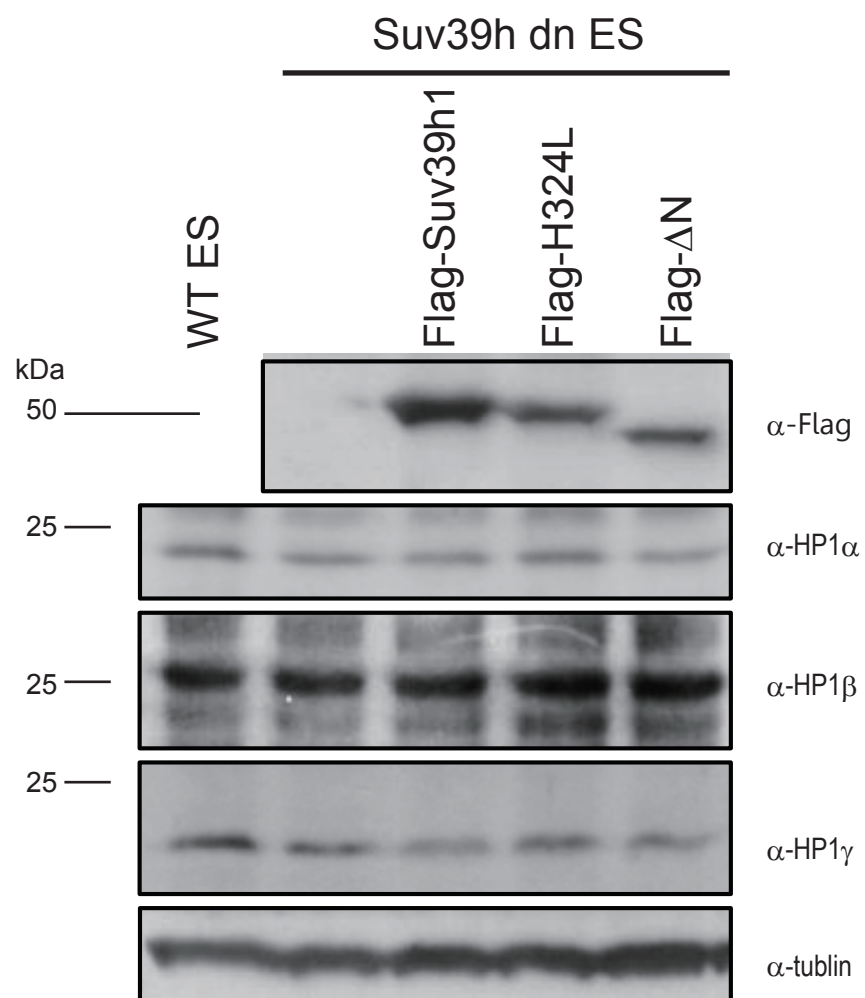


图 1 1

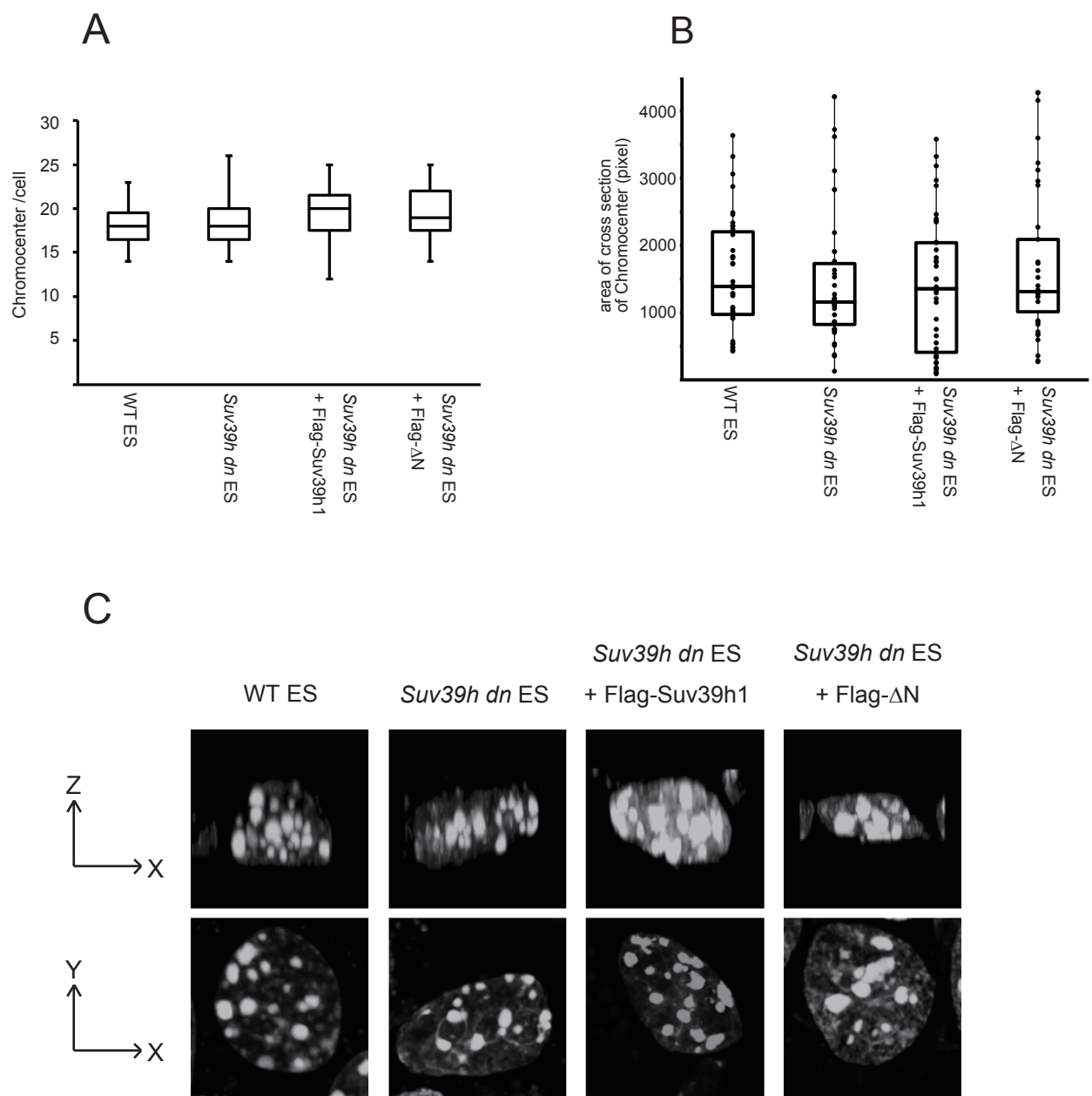


図 1 2

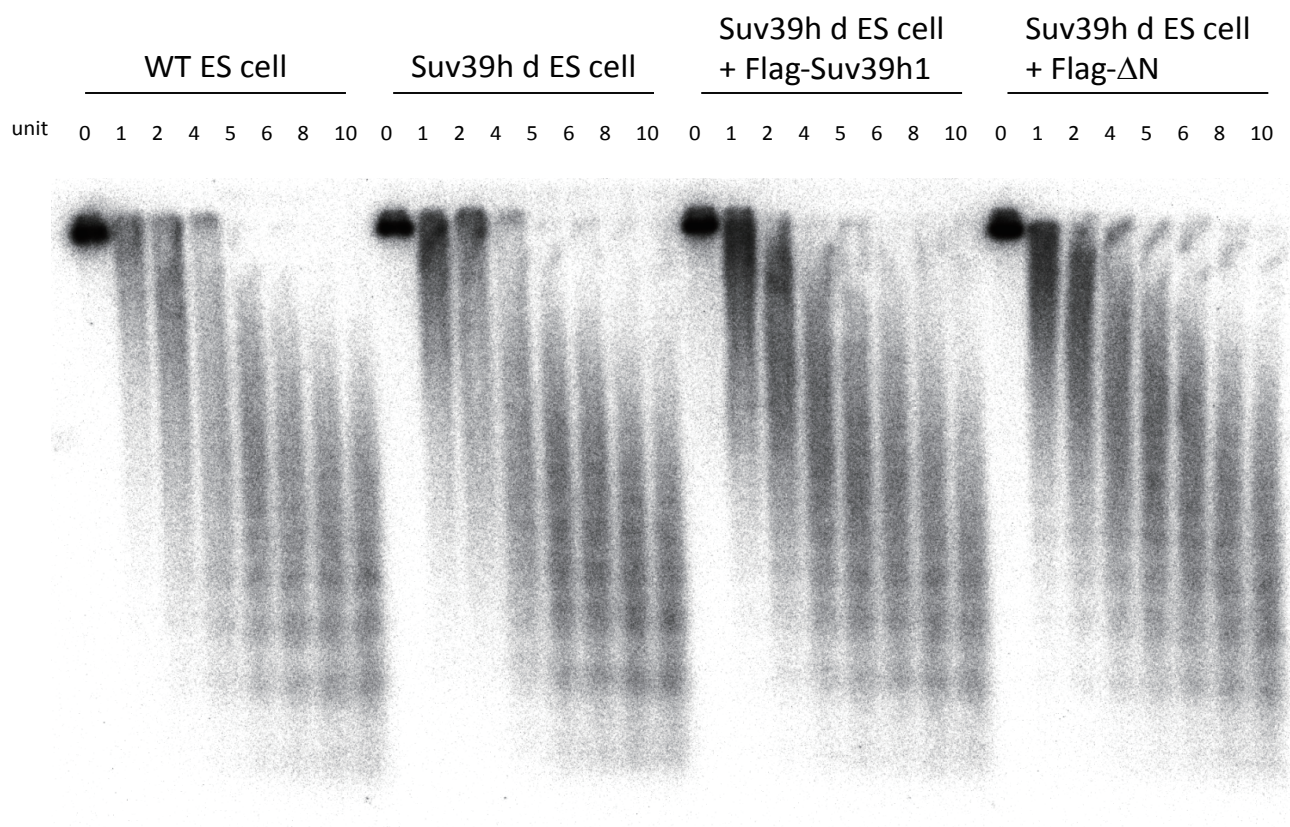
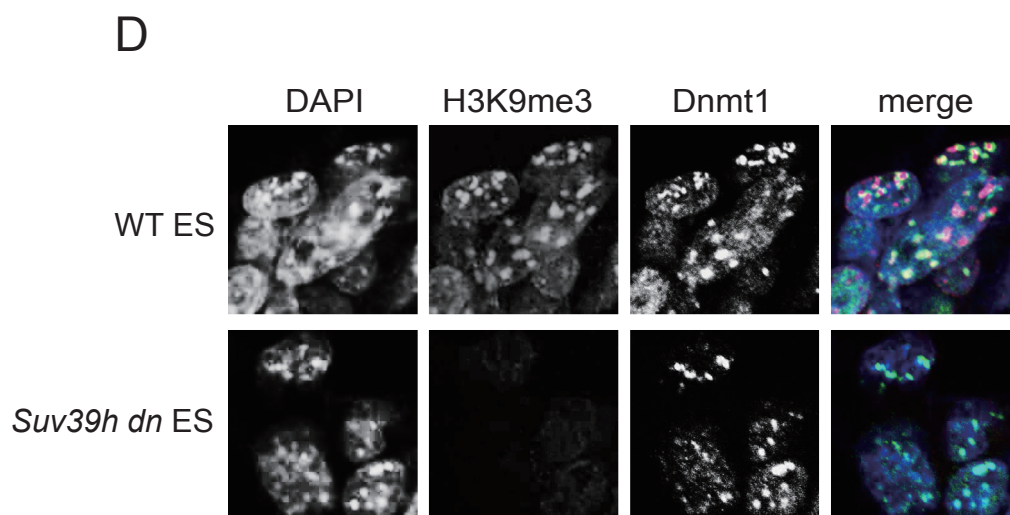
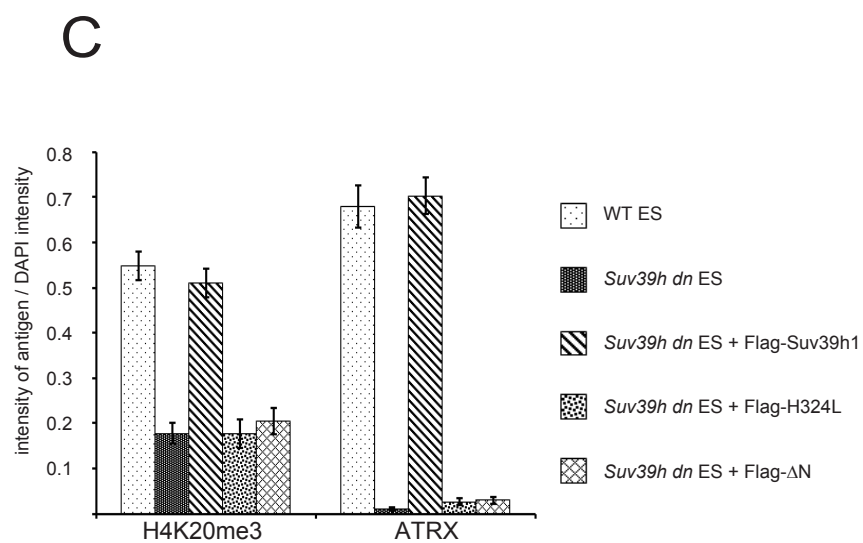
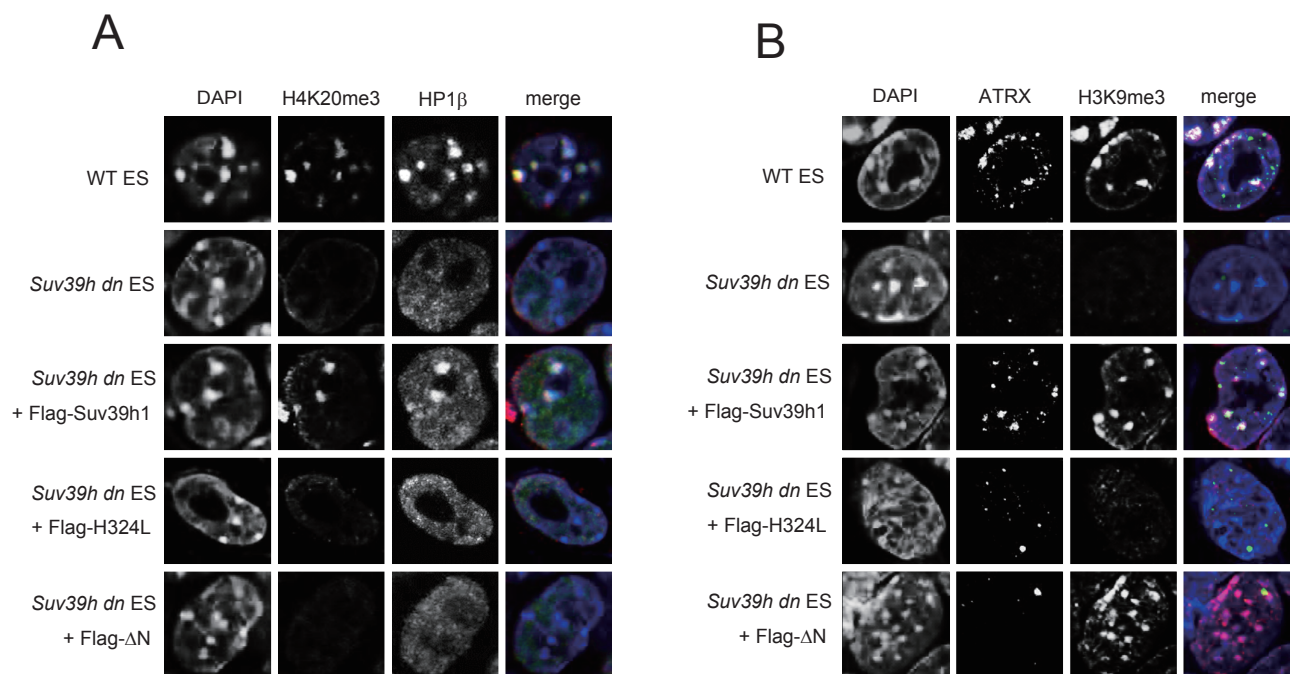


図 1 3





D

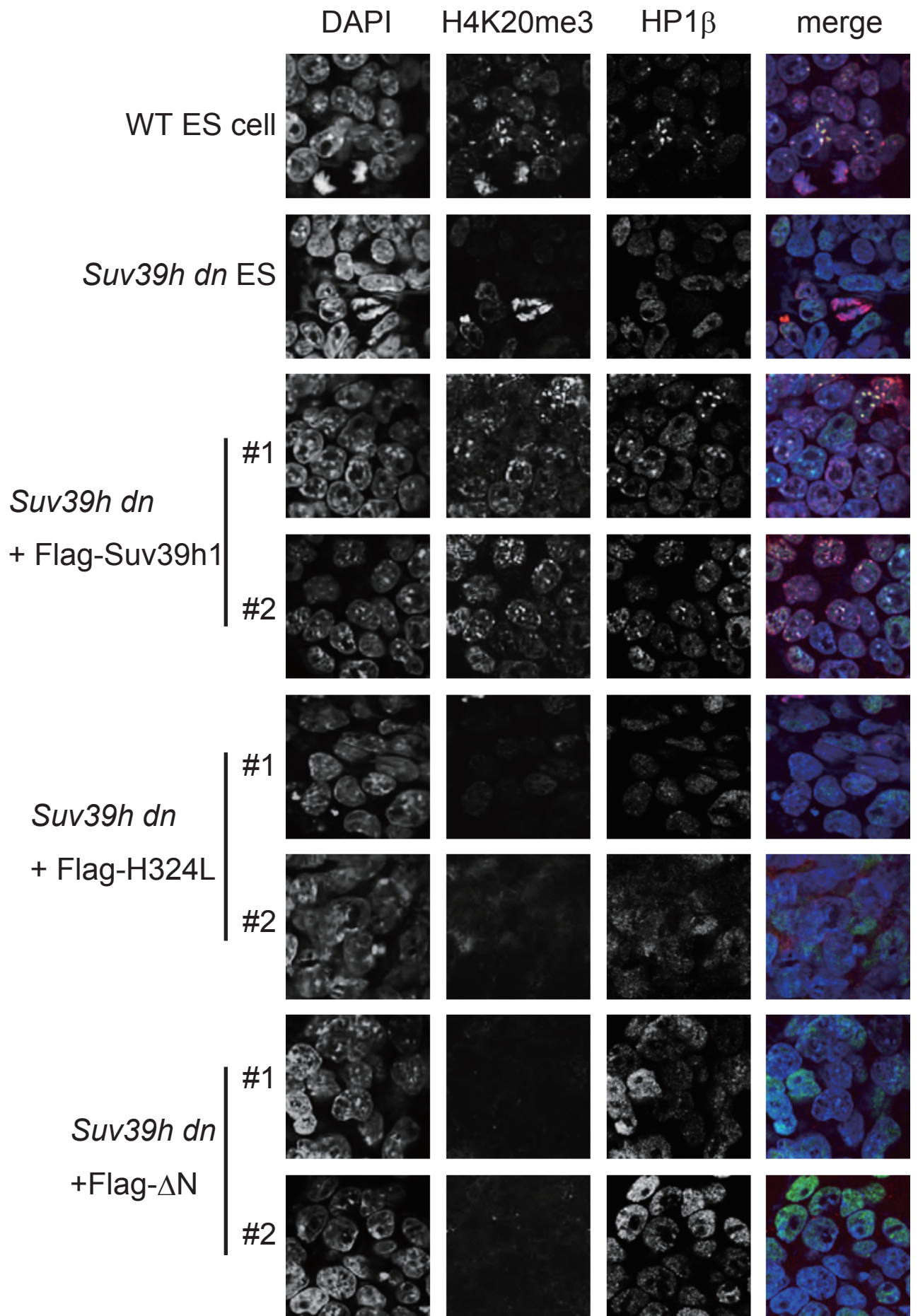
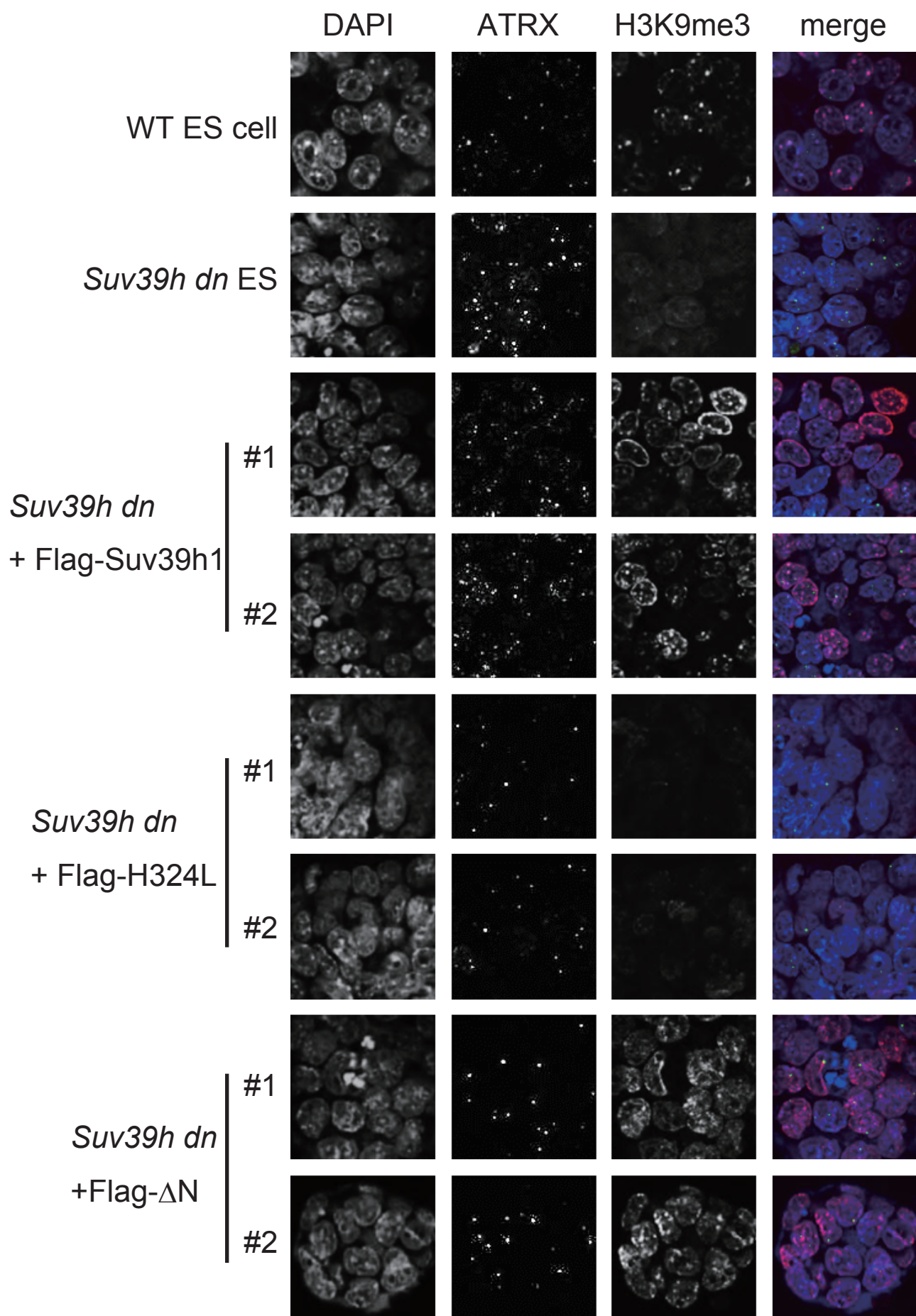


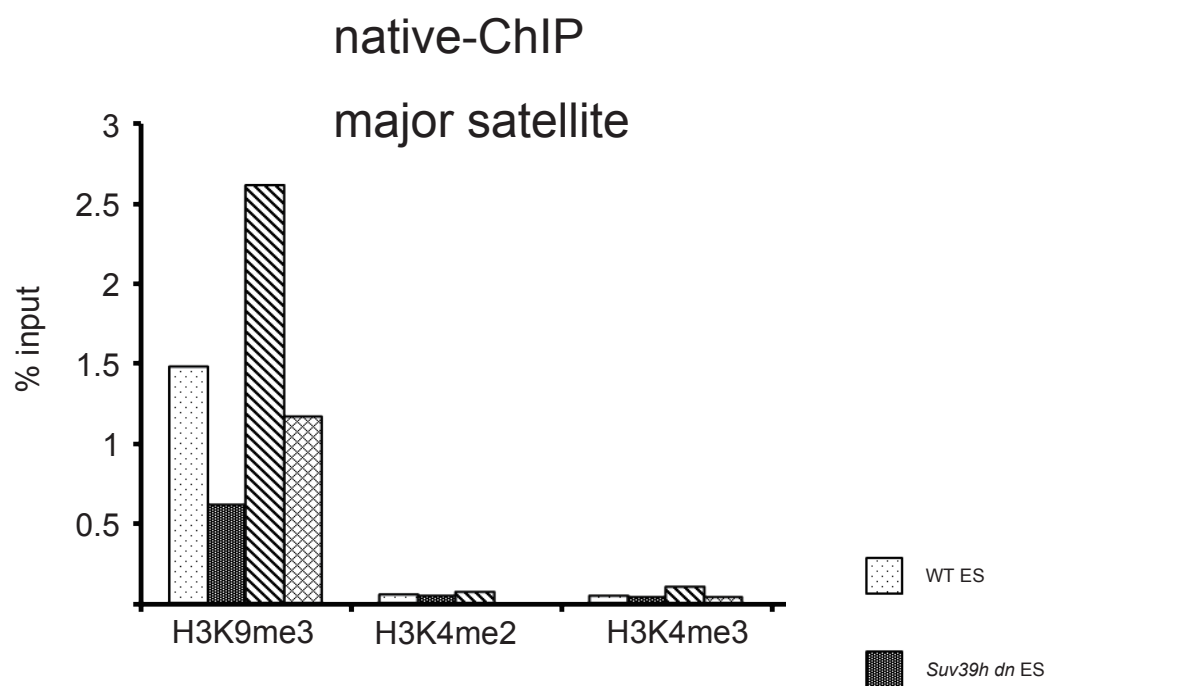
图 1 4

E





A



B

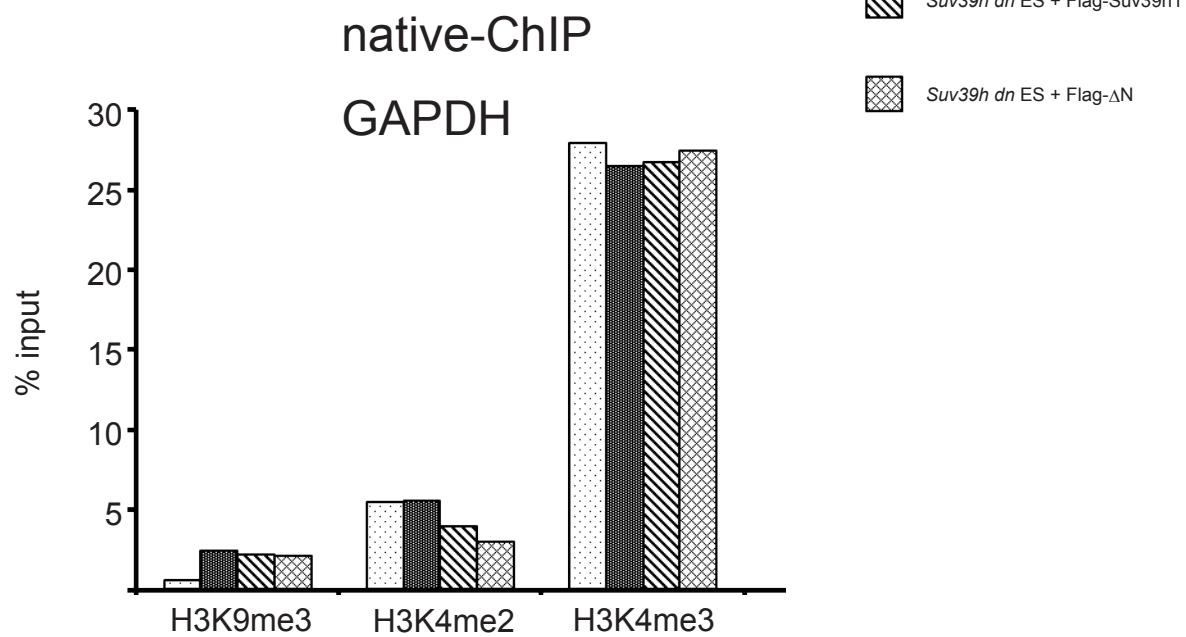


图 1 5

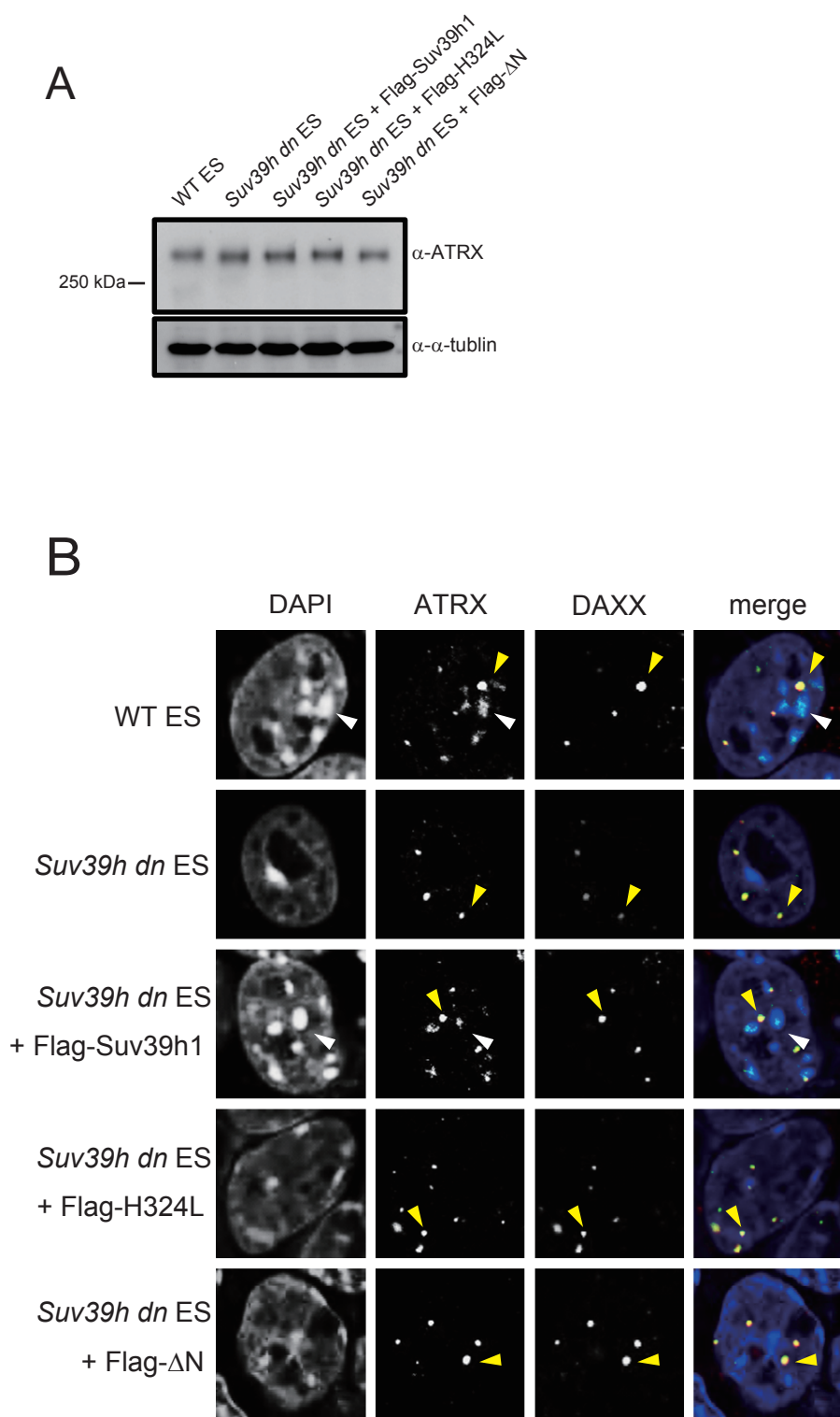


图 1 6

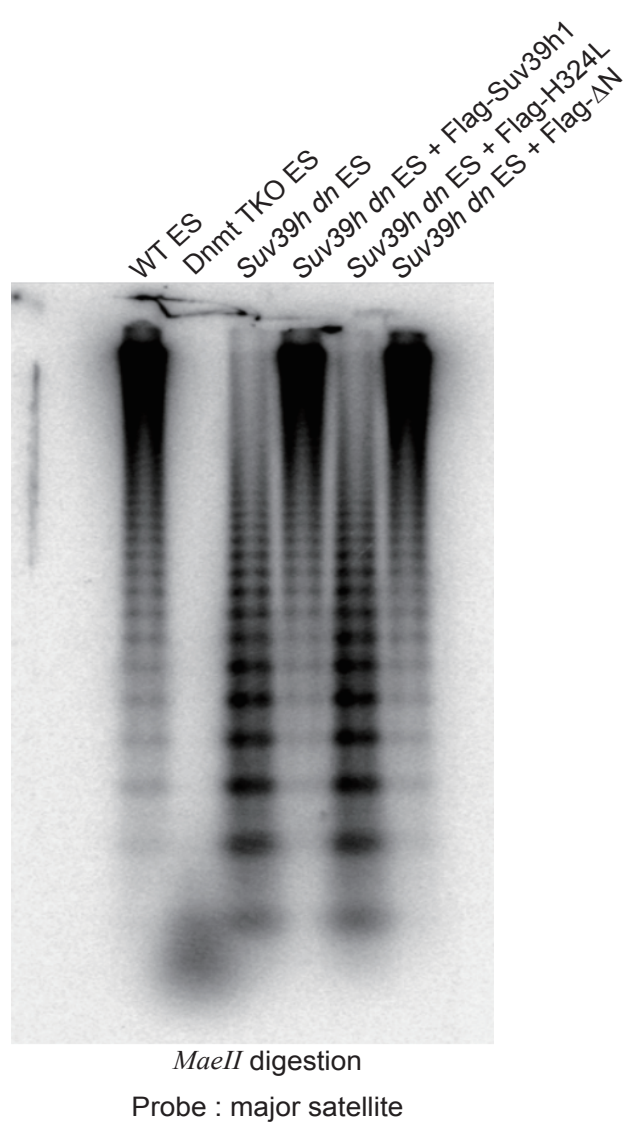


図 1 7

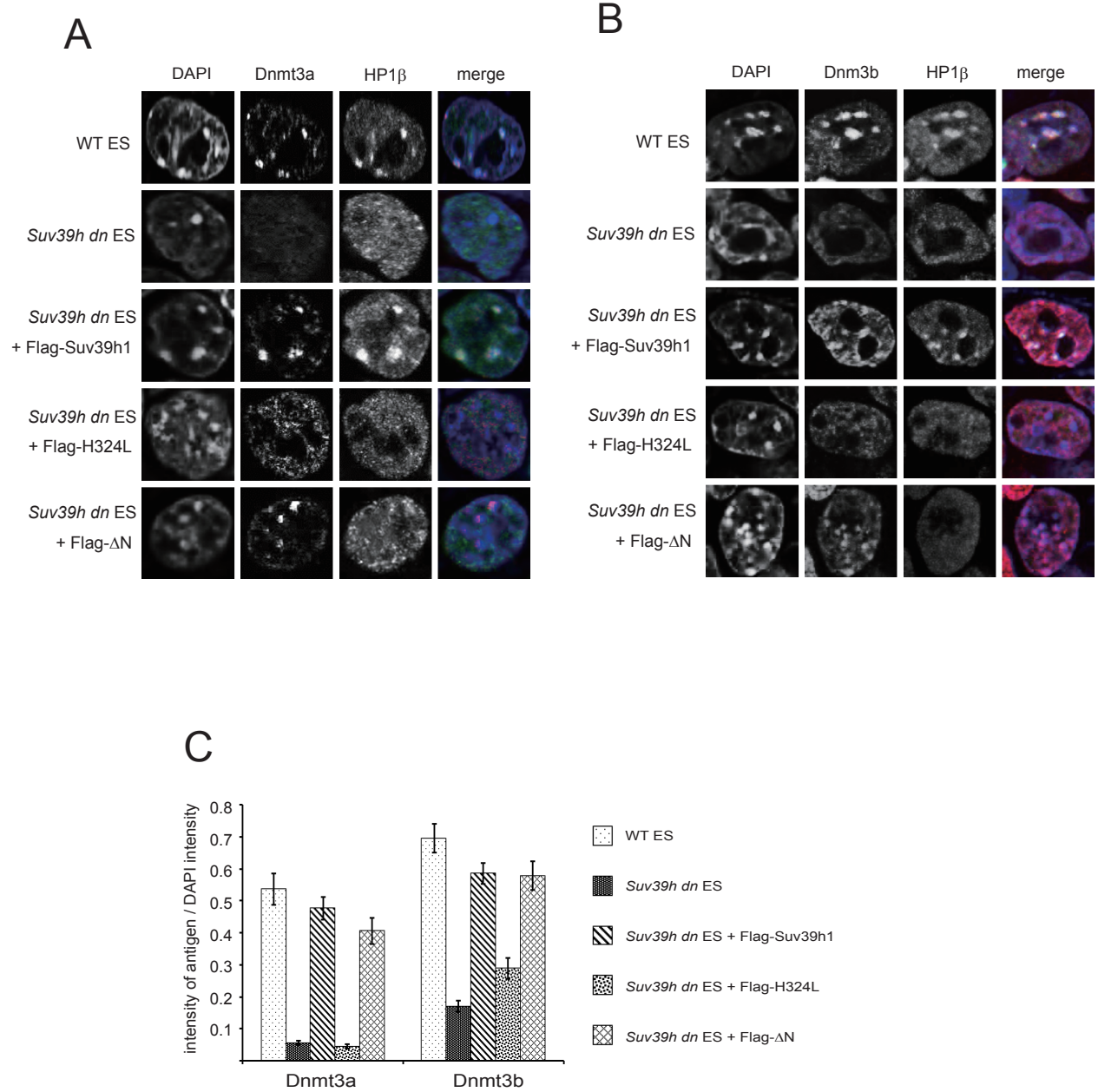
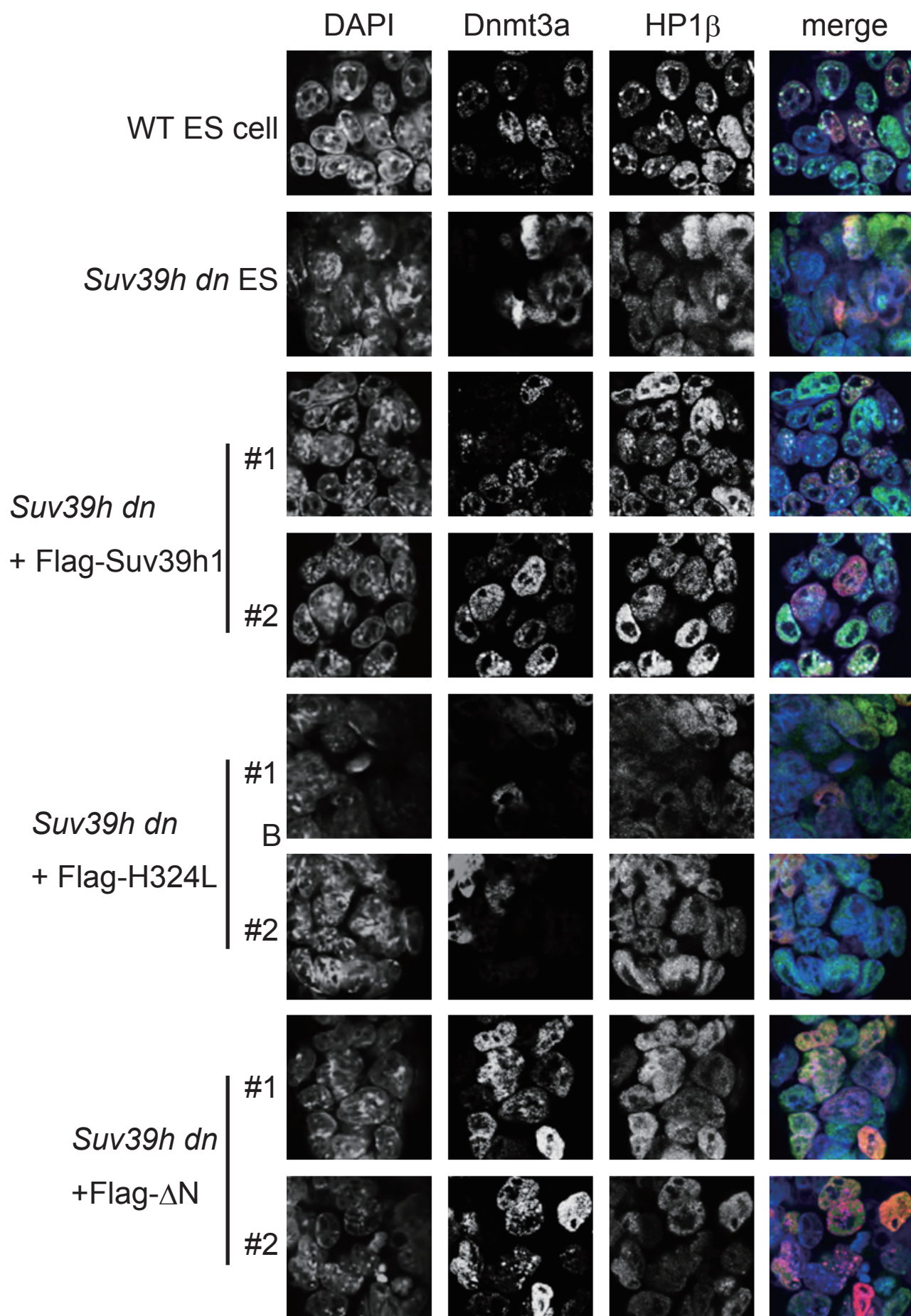


Figure 18

D





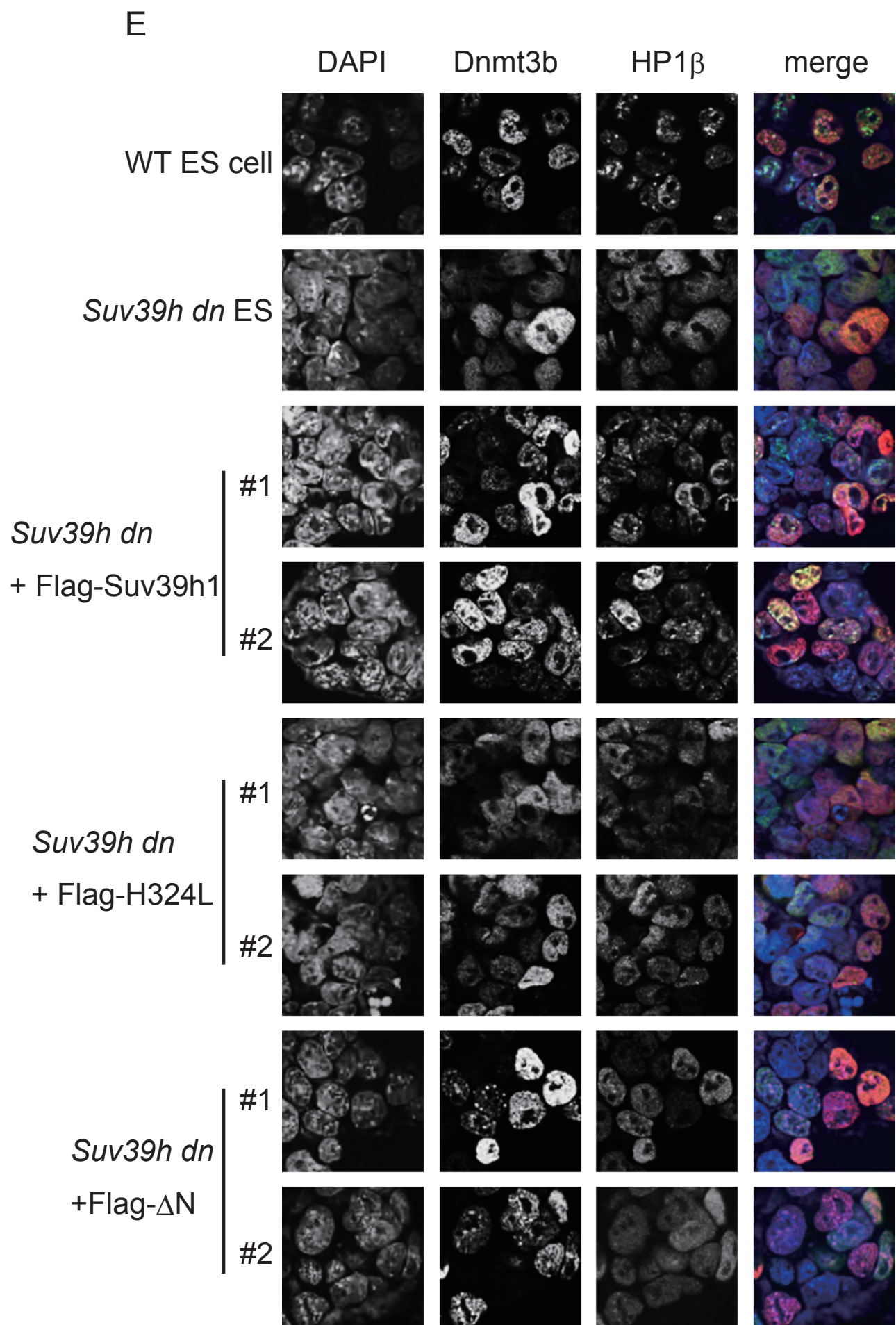


图 1 8

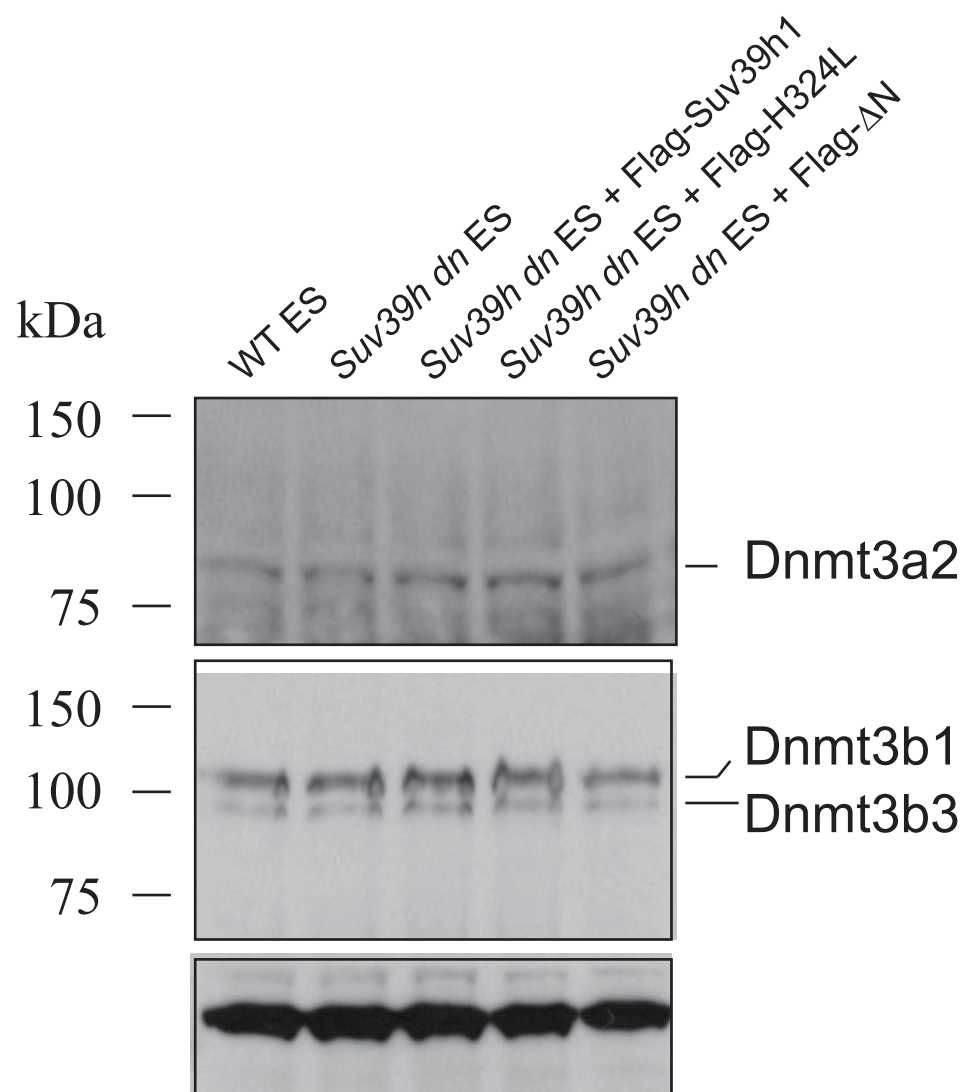
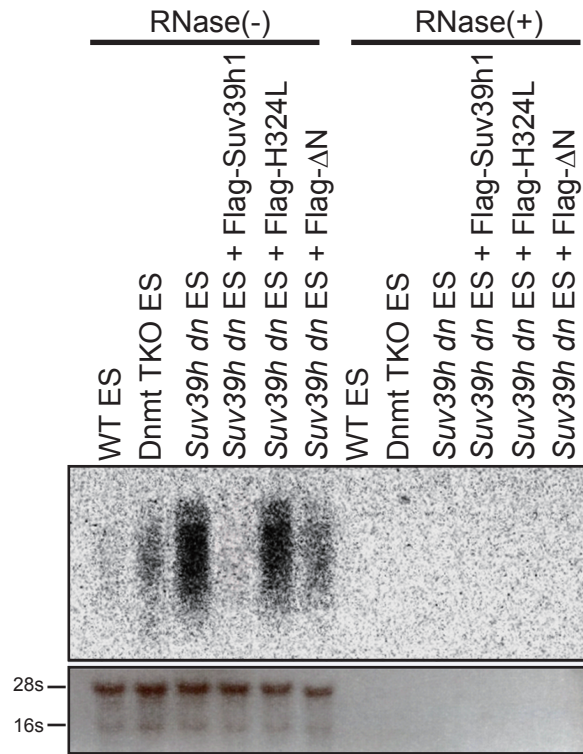


图 1 9

A



B

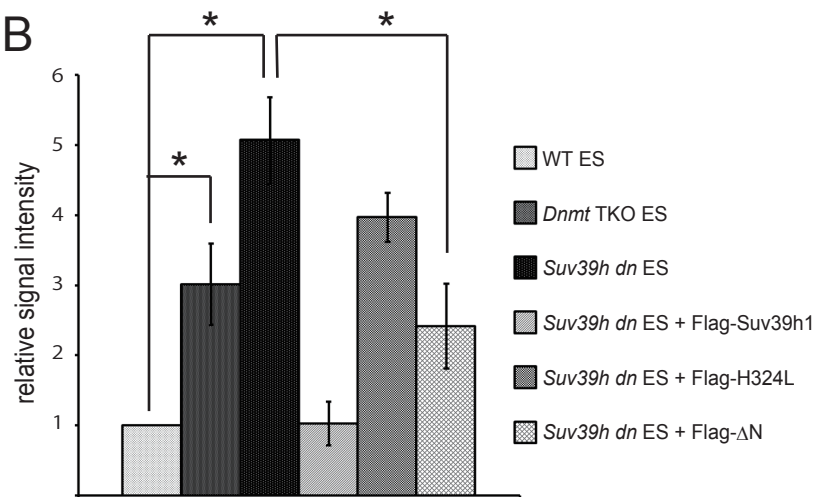
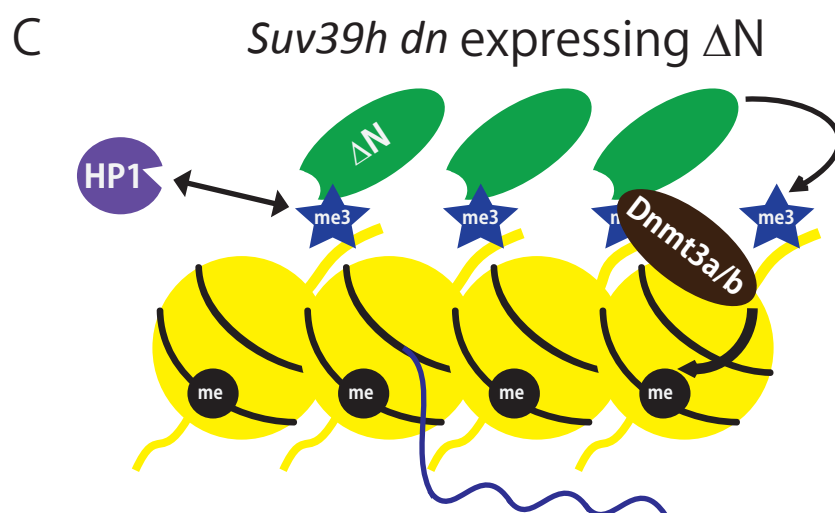
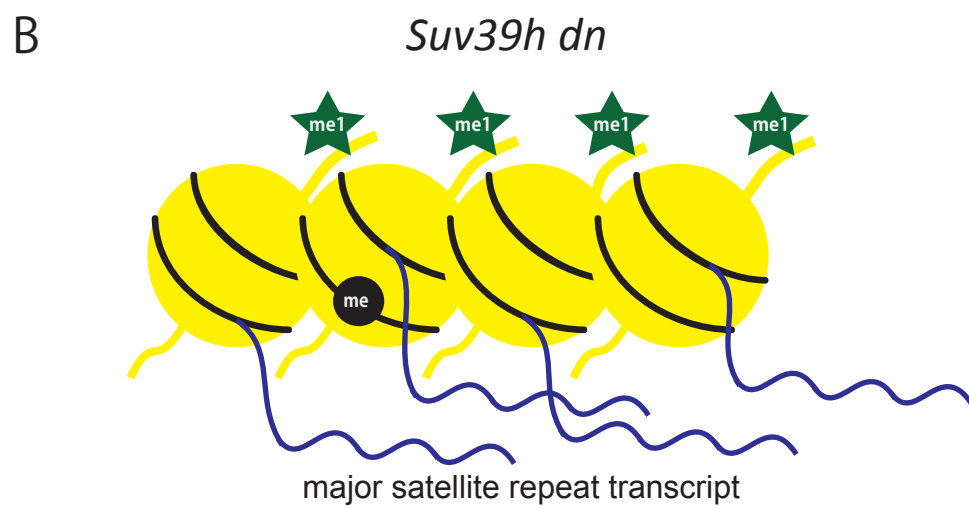
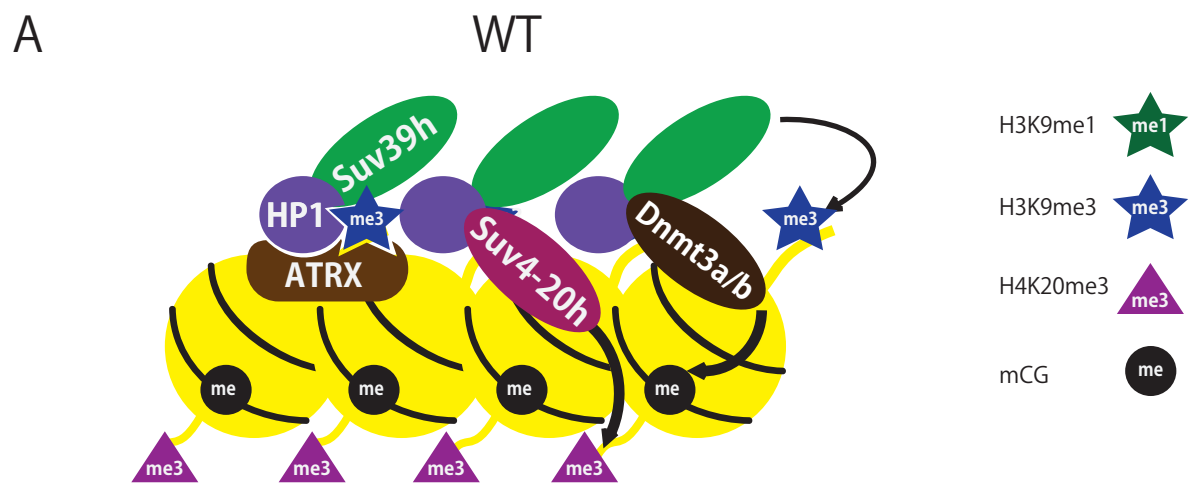


图 2 0





## 謝辞

本研究は理化学研究所の眞貝洋一博士と京都大学大学院生命科学研究科准教授の立花誠博士のご指導の下行いました。両博士には私の研究活動における様々な局面でご助力くださりここに深く御礼申し上げます。

また、本論文の根拠論文の共著者である大阪大学大学院生命機能研究科の木村宏博士には共焦点顕微鏡の操作方法、免疫染色写真の定量的解析についてご教示頂き、さらにヒストン修飾抗体を譲渡していただきました。そして、同じく共著者であるInstitut für Zell and Neurobiologie, Charite –UniversitätmedizinのPrim B. Singh博士には*Suv39h*のノックアウト細胞の譲渡と本研究の方針についての重要なご助言をいただきました。ここに深く御礼申し上げます。

本研究で使用した*Suv39h dn* ES細胞株はMax Plank instituteのThomas Jenuwein博士から譲渡していただきました。*Dnmt*トリプルノックアウト(*Dnmt*TKO)ES細胞は理化学研究所チームリーダーの岡野正樹博士に提供していただきました。また、北海道大学生命科学院教授の小布施力史博士、及び野澤竜介博士からはクロマチン免疫沈降法の実験手法等をご教示いただきました。以上の方々に深く御礼申し上げます。

最後に京都大学ウイルス研究所ゲノム改変マウス研究領域、並びに理化学研究所眞貝細胞記憶研究室の皆様には多大なご支援をいただきましたこと、ここに深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1       Epigenetics, Danny Reinberg (Editor), Thomas Jenuwein (Editor)
- 2       Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5. PubMed PMID: 10638745.
- 3       Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):116-20. PubMed PMID: 11242053.
- 4       Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):120-4. PubMed PMID: 11242054.
- 5       Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*. 2006;7(7):228. Review. PubMed PMID: 17224041; PubMed Central PMCID: PMC1779566.
- 6       Sanchez R, Zhou MM. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009 Sep;12(5):659-65. Review. PubMed PMID: 19736624; PubMed Central PMCID: PMC2921942.
- 7       Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*. 16(8), 919–32.
- 8       Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298(5595), 1039–43.
- 9       Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406(6796), 593–9.

- 10 Pedersen MT, Helin K. Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol.* 2010 Nov;20(11):662-71. doi: 10.1016/j.tcb.2010.08.011. Epub 2010 Sep 20. Review. PubMed PMID: 20863703.
- 11 de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):737-49. Review. PubMed PMID: 12429021; PubMed Central PMCID: PMC1223209.
- 12 Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15(24), 3286–95.
- 13 Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell* 8(6), 1207–17.
- 14 Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E (2002) ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 10(5), 1119–28.
- 15 Sedkov Y, Cho E, Petruk S, Cherbas L, Smith ST, Jones RS, Cherbas P, Canaani E, Jaynes JB, Mazo A (2003) Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature* 426(6962), 78–83.
- 16 Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* 419(6909), 857–62.
- 17 Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* 24(21), 9630–45.

- 18 Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292(5514), 110–3.
- 19 Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* 276(27), 25309–17.
- 20 Tamaru H, Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414(6861), 277–83.
- 21 Johnson L, Cao X, Jacobsen S (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol.* 12(16), 1360–7.
- 22 Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen RB. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least, evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 2001 Nov 1;29(21):4319-33. PubMed PMID: 11691919; PubMed Central PMCID: PMC60187.
- 23 Daujat S, Bauer UM, Shah V, Turner B, Berger S, Kouzarides T (2002) Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* 12(24), 2090–7.
- 24 Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt J (2003) Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 23(12), 4207–18.
- 25 Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* 12(12), 1052–8.

- 26 Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Ryan OW, Golshani A, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol. Cell* 11(3), 721–9.
- 27 Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432(7015), 406–11.
- 28 Strahl BD, Briggs SD, Brame CJ, Caldwell JA, Koh SS, Ma H, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DE, Stallcup MR, Allis CD (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr. Biol.* 11(12), 996–1000.
- 29 Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* 9(6), 1201–13.
- 30 Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18(11), 1251–62.
- 31 Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bähler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119(5), 603–14.
- 32 Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas MA (2003) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* 112(2), 77–86.
- 33 Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome

- p>integrates intrinsic and environmental signals.
- Nat Genet.*
- 2003 Mar;33 Suppl:245-54. Review. PubMed PMID: 12610534.
- 34 Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron.* 2007 Mar 15;53(6):857-69. Erratum in: *Neuron.* 2008 Sep 25;59(6):1051. PubMed PMID: 17359920.
  - 35 Selker EU, Freitag M, Kothe GO, Margolin BS, Rountree MR, Allis CD, Tamaru H. Induction and maintenance of nonsymmetrical DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16485-90. Epub 2002 Aug 20. Review. PubMed PMID: 12189210; PubMed Central PMCID: PMC139912.
  - 36 Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):116-20. PubMed PMID: 11242053.
  - 37 Yamamoto K, Sonoda M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 7;301(2):287-92. PubMed PMID: 12565857.
  - 38 Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003 May 1;31(9):2305-12. PubMed PMID: 12711675; PubMed Central PMCID: PMC154218.
  - 39 Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 28;318(2):544-55. PubMed PMID: 15120635.
  - 40 Vaute O, Nicolas E, Vandel L, Trouche D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 15;30(2):475-81. PubMed PMID: 11788710; PubMed Central PMCID: PMC99834.

- 41 Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, Nakao M. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):24132-8. Epub 2003 Apr 23. PubMed PMID: 12711603.
- 42 Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, Rosenfeld MG. Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*. 2002 Nov 29;298(5599):1747-52. Epub 2002 Oct 24. Erratum in: *Science*. 2003 Mar 14;299(5613):1663. PubMed PMID: 12399542.
- 43 Bantscheff M, Hopf C, Savitski MM, Dittmann A, Grandi P, Michon AM, Schlegl J, Abraham Y, Becher I, Bergamini G, Boesche M, Delling M, Dümpelfeld B, Eberhard D, Huthmacher C, Mathieson T, Poeckel D, Reader V, Strunk K, Sweetman G, Kruse U, Neubauer G, Ramsden NG, Drewes G. Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. *Nat Biotechnol*. 2011 Mar;29(3):255-65. doi: 10.1038/nbt.1759. Epub 2011 Jan 23. PubMed PMID: 21258344.
- 44 Estève PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev*. 2006 Nov 15;20(22):3089-103. Epub 2006 Nov 3. PubMed PMID: 17085482; PubMed Central PMCID: PMC1635145.
- 45 Chang Y, Sun L, Kokura K, Horton JR, Fukuda M, Espejo A, Izumi V, Koomen JM, Bedford MT, Zhang X, Shinkai Y, Fang J, Cheng X. MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nat Commun*. 2011 Nov 15;2:533. doi: 10.1038/ncomms1549. PubMed PMID: 22086334; PubMed Central PMCID: PMC3286832.
- 46 Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley TJ, Morrison JF. Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell*. 2004 Jun 18;14(6):727-38. PubMed PMID: 15200951.



- 47 Chin HG, Estève PO, Pradhan M, Benner J, Patnaik D, Carey MF, Pradhan S. Automethylation of G9a and its implication in wider substrate specificity and HP1 binding. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7313-23. Epub 2007 Oct 25. PubMed PMID: 17962312; PubMed Central PMCID: PMC2175347.
- 48 Yang L, Mei Q, Zielinska-Kwiatkowska A, Matsui Y, Blackburn ML, Benedetti D, Krumm AA, Taborsky GJ Jr, Chansky HA. An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J.* 2003 Feb 1;369(Pt 3):651-7. PubMed PMID: 12398767; PubMed Central PMCID: PMC1223118.
- 49 Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem.* 2006 Jul 14;281(28):19489-500. Epub 2006 May 8. PubMed PMID: 16682412.
- 50 Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A, Nakatani Y, Dent SY, Almouzni G. The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* 2009 Jul;10(7):769-75. doi: 10.1038/embor.2009.90. Epub 2009 Jun 5. PubMed PMID: 19498464; PubMed Central PMCID: PMC2727428.
- 51 Lyst MJ, Nan X, Stancheva I. Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins. *EMBO J.* 2006 Nov 15;25(22):5317-28. Epub 2006 Oct 26. PubMed PMID: 17066076; PubMed Central PMCID: PMC1636622.
- 52 Hassig CA, Tong JK, Fleischer TC, Owa T, Grable PG, Ayer DE, Schreiber SL. A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3519-24. PubMed PMID: 9520398; PubMed Central PMCID: PMC19868.
- 53 Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet.* 2000 Jan;24(1):88-91. PubMed PMID: 10615135.

- 54 Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*. 2001 May 15;20(10):2536-44. PubMed PMID: 11350943; PubMed Central PMCID: PMC125250.
- 55 Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN. Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7302-12. PubMed PMID: 12242305; PubMed Central PMCID: PMC139799.
- 56 Zoltewicz JS, Stewart NJ, Leung R, Peterson AS. Atrophin 2 recruits histone deacetylase and is required for the function of multiple signaling centers during mouse embryogenesis. *Development*. 2004 Jan;131(1):3-14. Epub 2003 Nov 26. PubMed PMID: 14645126.
- 57 Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):58-61. PubMed PMID: 10471499.
- 58 Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):58-61. PubMed PMID: 10471499.
- 59 Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):269-77. PubMed PMID: 10888872.
- 60 Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J*. 2002 Aug 1;21(15):4183-95. PubMed PMID: 12145218; PubMed Central PMCID: PMC126147.
- 61 Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between

- HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* 2007 May 15;21(10):1169-78. Epub 2007 Apr 30. PubMed PMID: 17470536; PubMed Central PMCID: PMC1865489.
- 62 Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F. MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells.* 2000 Aug;5(8):677-88. PubMed PMID: 10947852.
- 63 Kashiwagi K, Nimura K, Ura K, Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2011 Feb;39(3):874-88. doi: 10.1093/nar/gkq870. Epub 2010 Oct 4. PubMed PMID: 20923784; PubMed Central PMCID: PMC3035464.
- 64 Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell.* 2001 Apr;7(4):729-39. PubMed PMID: 11336697.
- 65 Bérubé NG, Smeenk CA, Picketts DJ. Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1;9(4):539-47. PubMed PMID: 10699177.
- 66 Agarwal N, Hardt T, Brero A, Nowak D, Rothbauer U, Becker A, Leonhardt H, Cardoso MC. MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(16):5402-8. Epub 2007 Aug 13. PubMed PMID: 17698499; PubMed Central PMCID: PMC2018631.
- 67 Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S, Bird A. Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 20;104(8):2709-14. Epub 2007 Feb 12. PubMed PMID: 17296936; PubMed Central PMCID: PMC1796997.

- 68 中山潤一「ヘテロクロマチンタンパク質 HP1」生体の科学 2011 年 9-10 月号  
62(5): 466-467 (2011)
- 69 Schotta G, Ebert A, Reuter G. SU(VAR)3-9 is a conserved key function  
inheterochromatic gene silencing. *Genetica*. 2003 Mar;117(2-3):149-58.  
Review.PubMed PMID: 12723694.
- 70 Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S,  
Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin  
structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000 Aug  
10;406(6796):593-9. PubMed PMID: 10949293.
- 71 Almouzni G, Probst AV. Heterochromatin maintenance and establishment:  
lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus*. 2011 Sep-Oct;2(5):332-8. doi:  
<http://dx.doi.org/10.4161/nucl.2.5.17707>. Epub 2011 Sep 1. Review. PubMed  
PMID: 21941119.
- 72 Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C,  
Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M,  
Sibilia M, Jenuwein T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs  
mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 2001 Nov  
2;107(3):323-37. PubMed PMID: 11701123.
- 73 Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S,  
Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9  
methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric  
heterochromatin. *Curr Biol*. 2003 Jul 15;13(14):1192-200. PubMed PMID:  
12867029.
- 74 Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. Differential subnuclear localization and  
replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol Biol Cell*.  
2005 Jun;16(6):2872-81. Epub 2005 Mar 23. PubMed PMID: 15788566;  
PubMed Central PMCID: PMC1142431.
- 75 Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba  
T, Nakao M. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the

- Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):24132-8. Epub 2003 Apr 23. PubMed PMID: 12711603.
- 76 Eskeland R, Eberharter A, Imhof A. HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol.* 2007 Jan;27(2):453-65. Epub 2006 Nov 13. PubMed PMID: 17101786; PubMed Central PMCID: PMC1800810.
- 77 Yamamoto K, Sonoda M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 7;301(2):287-92. PubMed PMID: 12565857.
- 78 Aagaard L, Schmid M, Warburton P, Jenuwein T. Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J Cell Sci.* 2000 Mar;113 ( Pt 5):817-29. PubMed PMID: 10671371.
- 79 Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritzsche C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M, Son J, Reinberg D, Lachner M, Jenuwein T. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell.* 2012 Aug 31;150(5):948-60. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.048. PubMed PMID: 22939622.
- 80 Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H, Shi Y. ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Jun 12;18(7):769-76. doi: 10.1038/nsmb.2062. PubMed PMID: 21666679; PubMed Central PMCID: PMC3130887.
- 81 Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 2004 Jun 1;18(11):1251-62. Epub 2004 May 14. PubMed PMID: 15145825; PubMed Central PMCID: PMC420351.

- 82 Yang H, Pesavento JJ, Starnes TW, Cryderman DE, Wallrath LL, Kelleher NL, Mizzen CA. Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):12085-92. doi: 10.1074/jbc.M707974200. Epub 2008 Feb 21. PubMed PMID: 18296440; PubMed Central PMCID: PMC2335358.
- 83 Picketts DJ, Higgs DR, Bachoo S, Blake DJ, Quarrell OW, Gibbons RJ. ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet*. 1996 Dec;5(12):1899-907. PubMed PMID: 8968741.
- 84 Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H, Shi Y. ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol*. Central PMCID: PMC3130887.2011 Jun 12;18(7):769-76. doi: 10.1038/nsmb.2062. PubMed PMID: 21666679; PubMed
- 85 Bérubé NG, Smeenk CA, Picketts DJ. Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Hum Mol Genet*. 2000 Mar 1;9(4):539-47. PubMed PMID: 10699177.
- 86 Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, Garrick D, Clynes D, Gibbons RJ, Rhodes D, Higgs DR, Neuhaus D. Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jun 12;18(7):777-82. doi: 10.1038/nsmb.2070. PubMed PMID: 21666677.
- 87 Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep*. 2009 Nov;10(11):1235-41. doi: 10.1038/embor.2009.218. Epub 2009 Oct 16. PubMed PMID: 19834512; PubMed Central PMCID: PMC2775176.
- 88 Xue Y, Gibbons R, Yan Z, Yang D, McDowell TL, Sechi S, Qin J, Zhou S, Higgs D, Wang W. The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling

- complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):10635-40. Epub 2003 Sep 2. PubMed PMID: 12953102; PubMed Central PMCID: PMC196856.
- 89 Xhemalce B. From histones to RNA: role of methylation in cancer. *Brief Funct Genomics*. 2013 Jan 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23313959.
  - 90 Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J*. 2005 Feb 23;24(4):800-12. Epub 2005 Jan 27. PubMed PMID: 15678104; PubMed Central PMCID: PMC549616.
  - 91 Santenard A, Ziegler-Birling C, Koch M, Tora L, Bannister AJ, Torres-Padilla ME. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*. 2010 Sep;12(9):853-62. doi: 10.1038/ncb2089. Epub 2010 Aug 1. PubMed PMID: 20676102.
  - 92 Probst AV, Okamoto I, Casanova M, El Marjou F, Le Baccon P, Almouzni G. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell*. 2010 Oct 19;19(4):625-38. doi: 10.1016/j.devcel.2010.09.002. PubMed PMID: 20951352.
  - 93 Ting DT, Lipson D, Paul S, Brannigan BW, Akhavanfard S, Coffman EJ, Contino G, Deshpande V, Iafrate AJ, Letovsky S, Rivera MN, Bardeesy N, Maheswaran S, Haber DA. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*. 2011 Feb 4;331(6017):593-6. doi: 10.1126/science.1200801. Epub 2011 Jan 13. PubMed PMID: 21233348.
  - 94 Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR, Nakayama J, Okano M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*. 2006 Jul;11(7):805-14. PubMed PMID: 16824199.
  - 95 Velichko AK, Kantidze OL, Razin SV. HP1 $\alpha$  is not necessary for the structural maintenance of centromeric heterochromatin. *Epigenetics*. 2011 Mar;6(3):380-7.

- Epub 2011 Mar 1. PubMed PMID: 20962594; PubMed Central PMCID: PMC3092686.
- 96 Mateos-Langerak J, Brink MC, Luijsterburg MS, van der Kraan I, van Driel R, Verschure PJ. Pericentromeric heterochromatin domains are maintained without accumulation of HP1. *Mol Biol Cell*. 2007 Apr;18(4):1464-71. Epub 2007 Feb 21. PubMed PMID: 17314413; PubMed Central PMCID: PMC1838966.
  - 97 Zhang K, Mosch K, Fischle W, Grewal SI. Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Apr;15(4):381-8. doi: 10.1038/nsmb.1406. Epub 2008 Mar 16. PubMed PMID: 18345014.
  - 98 Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J. Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Mol Cell*. 2012 Jul 27;47(2):228-41. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.017. Epub 2012 Jun 21. PubMed PMID: 22727667
  - 99 Wang T, Xu C, Liu Y, Fan K, Li Z, Sun X, Ouyang H, Zhang X, Zhang J, Li Y, Mackenzie F, Min J, Tu X. Crystal structure of the human SUV39H1 chromodomain and its recognition of histone H3K9me2/3. *PLoS One*. 2012;7(12):e52977. doi: 10.1371/journal.pone.0052977. Epub 2012 Dec 28. PubMed PMID: 23285239; PubMed Central PMCID: PMC3532415.
  - 100 Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, Hirshberg M, Verreault A, Murzina NV, Laue ED. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J*. 2004 Feb 11;23(3):489-99. Epub 2004 Feb 5. PubMed PMID: 14765118; PubMed Central PMCID: PMC1271814.
  - 101 Haldar S, Saini A, Nanda JS, Saini S, Singh J. Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem*. 2011 Mar 18;286(11):9308-20. doi: 10.1074/jbc.M110.143198. Epub 2011 Jan 11. PubMed



PMID: 21224386; PubMed Central PMCID: PMC3058978.

- 102 Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* 2007 May 15;21(10):1169-78. Epub 2007 Apr 30. PubMed PMID: 17470536; PubMed Central PMCID: PMC1865489.
- 103 Alper BJ, Lowe BR, Partridge JF. Centromeric heterochromatin assembly in fission yeast--balancing transcription, RNA interference and chromatin modification.